

Estudio de la bioactividad y de la biocompatibilidad de aerogeles híbridos de sílice con aplicaciones en ingeniería tisular ósea.



Facultad de Ciencias
Grado en Biotecnología

Departamento de Física de la Materia Condensada

- Tutores del Trabajo de Fin de Grado: Manuel Piñero de los Ríos y Nicolás de la Rosa-Fox

-Autor del Trabajo de Fin de Grado: Rafael Jesús Pardo Velasco

Puerto Real, Curso 2020-2021.

Índice

1. Propuesta del TFG.....	4
2. Resumen.....	5
3. Abstract.	6
4. Introducción.	7
4.1. Generalidades del tejido óseo. Estructura histológica y composición bioquímica y celular.	7
4.2. Lesión del tejido óseo. Empleo de biomateriales híbridos con capacidad regenerativa en medicina.	8
4.3. Utilización de aerogeles mesoporosos basados en sílice/quitosano como scaffolds biocompatibles.	10
5. Objetivos e hipótesis.	12
6. Metodología, resultados y discusión.	13
6.1. Síntesis de los aerogeles.....	13
6.2. Estudio de la estructura química y las propiedades texturales.	17
6.3. Estudio de las propiedades mecánicas y viscoelásticas.....	24
6.4. Estudio de la bioactividad <i>in vitro</i>	31
6.5. Estudio de la biocompatibilidad en cultivos celulares primarios.	35
6.6. Estudio de la degradación <i>in vitro</i>	39
7. Conclusiones y perspectivas de futuro.	41
9. Bibliografía.....	43
10. Apéndices.	44
Apéndice A: Listado de siglas y acrónimos empleados ordenados alfabéticamente.	44

1. Propuesta del TFG.

Título.

Estudio de la bioactividad y de la biocompatibilidad de aerogeles híbridos de sílice con aplicaciones en Ingeniería tisular ósea

Descripción.

El proceso de fractura en el hueso es complejo desde un punto de vista tanto estructural como funcional. Desde el punto de vista mecánico, la viscoelasticidad, y la tenacidad a la fractura, son parámetros a controlar para mejorar la biocompatibilidad mecánica de ciertos biomateriales. Algunos materiales porosos resultantes de la hibridación de la sílice con determinados biopolímeros han resultado ser bioactivos y biocompatibles. Por ello, presentan propiedades potencialmente interesantes para su utilización en ingeniería tisular como regeneradores de tejido óseo. El presente trabajo se centrará en el desarrollo vía sol-gel de un aerogel híbrido de sílice con un 20 % en peso de quitosano, para su aplicación en ingeniería tisular ósea. Este trabajo tiene la intención de servir como iniciación a una investigación de carácter multidisciplinar, que combina la Ingeniería de tejidos y la Ciencia de materiales. Se propone la síntesis del aerogel con la composición elegida, el estudio de sus propiedades estructurales y mecánicas y la evaluación de la respuesta in vitro de osteoblastos en cultivo primario. Para llevar a cabo éste último objetivo, se cuenta con la colaboración del grupo de investigación de CTS253 Patobiología del INIBICA, dirigido por la Dra. Mercedes Salido Peracaula.

2. Resumen.

El tejido óseo es el principal componente del sistema esquelético y de los órganos de sostén. Está formado por una matriz orgánica mineralizada y por un conjunto de células diferentes (osteoblastos, osteoclastos, células osteoprogenitoras, células de revestimiento...).

A pesar de ser un tejido resistente mecánicamente, el tejido óseo es capaz de fracturarse y lesionarse, requiriendo en ocasiones de complicadas cirugías que permiten mantener los huesos en una postura estática. En ocasiones el proceso de curación del tejido se ve apoyado por la implantación de injertos óseos procedentes de un donante humano o animal.

En los últimos años el diseño de nuevos biomateriales híbridos, entre ellos materiales basados en la sílice abren una nueva ventana al tratamiento de este tipo de fracturas. Estos materiales parecen presentar estructuras mesoporosas, además de propiedades bioactivas en cultivos celulares osteoblásticos, ser biocompatibles y biodegradables.

En este trabajo se sintetizó y caracterizó química, mecánica y biológicamente uno de estos materiales: un aerogel híbrido de Sílice-quitosano al 20% en peso. Para ello se emplearon diversas técnicas de análisis (fisisorción de nitrógeno, ensayos de compresión uniaxial, cultivos celulares, ensayos de inmersión en fluido corporal simulado...).

El trabajo presente tiene como objetivo fundamental estudiar la bioactividad y biocompatibilidad de los aerogeles sintetizados, para responder a la pregunta de si podrían ser empleados como sustitutos de estos injertos en cirugía.

Los resultados de bioactividad y biocompatibilidad revelan que estos materiales podrían emplearse con este fin, dada a la formación de depósitos de hidroxiapatita, visibles en microscopía electrónica de barrido y a la tasa de viabilidad medida en los cultivos celulares.

Como conclusión podemos extraer que el empleo de estos materiales como sustitutos de injertos óseos es posible, aunque para confirmarlo definitivamente, se requerirán estudios futuros más exhaustivos, que incluyan modelos murinos y ensayos clínicos.

3. Abstract.

Bone tissue is the main component of skeletal system and supportive organs. It is constituted by an organic mineralized matrix and a set of many different cells. (osteoblasts, osteoclasts, osteoprogenitor cells, lining cells...).

Although bone tissue is mechanically resistant, it can be fractured and injured. In occasions this requires challenging surgeries whose purpose is maintaining fractured-bones in a static position. In several occasions, the tissue's healing process is supported by the implantation of bone grafts, which proceed from human and animal donors.

In the last years, new hybrid biomaterials have been designed, including silica-based biomaterials. All of them provide a new opportunity for treatments of this type of fractures. These biomaterials seem to have mesoporous structures. Furthermore, they seem to have bioactive properties in osteoblastic cultures and they are biocompatible and biodegradable.

In this work, one of these biomaterials was synthesized and characterized chemically, mechanically and biologically: an hybrid aerogel of silica-Chitosan with 20% of chitosan in weight. To achieve this purpose, several analytical techniques were used. (physisorption of nitrogen, uniaxial compression tests, cell cultures, immersion in body simulated fluid test...).

The main goal of this work is to study the bioactivity and biocompatibility of synthesized aerogels, to know whether or not they could be used as substitutes of bone grafts in surgery.

The results of bioactivity and biocompatibility tests reveal that these materials could be used for this purpose, due to the formation of hydroxyapatite deposits, which can be seen in swept electronic microscopy, and the measured viability rate in cell cultures.

As a conclusion, we can draw that the use of these materials as a substitute of bone injects is possible, although more exhaustive studies, which include mouse models and clinical essays, should be required in the future.

4. Introducción.

4.1. Generalidades del tejido óseo. Estructura histológica y composición bioquímica y celular.

El tejido óseo representa el principal componente del sistema esquelético, jugando un papel fundamental en la estructura de los órganos de sostén, además de servir de punto de anclaje a los principales sistemas musculares.

De acuerdo con (Ross & Paulina, 2007, págs. 218-219), el tejido óseo es una forma especializada de tejido conjuntivo, en la que la matriz extracelular se encuentra mineralizada por fosfato de calcio en forma de cristales de hidroxipatita (HAp) (Apéndice A). Además de estos minerales, la matriz ósea está formada por fibras de colágeno tipo I y por otros componentes tales como proteoglucanos, glucoproteínas multiadhesivas, proteínas dependientes de vitamina K osteoespecífica como la osteocalcina, factores de crecimiento y citocinas. El tejido óseo alberga diversas poblaciones celulares diferentes. Entre ellas encontramos células osteoprogenitoras, que generan osteoblastos; osteoblastos, que sintetizan los componentes de la matriz extracelular; osteocitos, u osteoblastos maduros rodeados de matriz; células de revestimiento óseo que permanecen en la superficie; y osteoclastos, que son encargadas de eliminar y remodelar las regiones en las que el tejido ha sido dañado.

Según (Geneser, Qvortrup, Trandum-Jensen, Christensen, & Bruel, 2012, págs. 261-262), el tejido óseo se organiza de forma macroscópica de dos formas diferentes: el tejido óseo compacto o cortical, formado por una masa sólida sin intersticios, y el tejido óseo esponjoso o trabecular, formado por un conjunto de finos listones llamados trabéculas dispuestos de forma reticular (fig. 1). En cuanto a su estructura microscópica, según (Ross & Paulina, 2007, págs. 222-223) el tejido óseo se compone principalmente de unidades cilíndricas llamadas osteonas o sistemas de Havers, (fig. 2) consistentes en laminillas concéntricas que rodean un conducto central llamado conducto o canal de Havers en el cual encontramos vasos y nervios. De acuerdo con (Geneser, Qvortrup, Trandum-Jensen, Christensen, & Bruel, 2012, pág. 263), en las osteonas encontramos restos de laminillas antiguas llamadas laminillas intersticiales y, además, presentan un límite neto denominado línea de cemento.



Figura 1: Corte longitudinal de un fémur: En la figura se puede apreciar la presencia del tejido óseo compacto en la superficie exterior del fémur, así como la estructura trabecular del tejido óseo esponjoso, situado en el interior.

(Fuente: Fineartamerica.com, <https://fineartamerica.com/featured/femur-longitudinal-section-lm-science-stock-photography.html?product=art-print>)

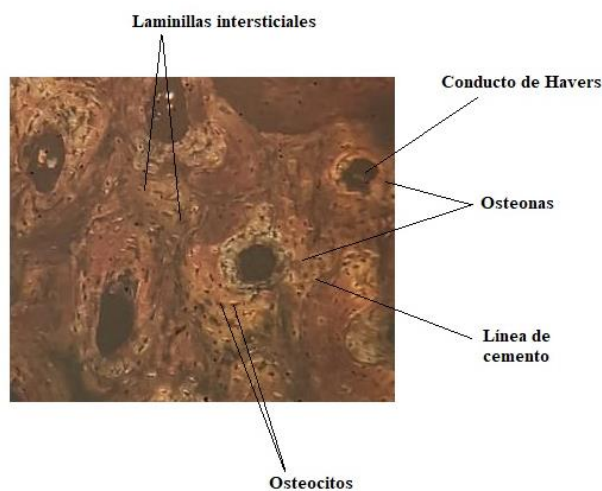


Figura 2: Microfotografía de un corte transversal de un hueso: En la figura se aprecian varios sistemas de Havers, así como las principales estructuras histológicas de éstos.

4.2. Lesión del tejido óseo. Empleo de biomateriales híbridos con capacidad regenerativa en medicina.

Como cualquier otro tejido del cuerpo humano, el tejido óseo puede lesionarse y fracturarse si se somete a un evento traumático lo suficientemente intenso como para producir su rotura. De acuerdo con (Clark, 2014), el riesgo de fracturas en niños varones con edades entre 0 y 16 años está entre el 42% y el 64% y en niñas en el mismo grupo de edad está entre el 27% y el 40%. La tasa de fracturas en la niñez se encuentra comprendida entre los 12,0 y 36,1/1000 casos al año. Según un estudio publicado por (Pietu, y otros, 2014), entre los años 2011 y 2012 se registraron en doce hospitales franceses 183 casos de fractura distal de fémur en 177 pacientes con una edad superior a 15 años.

A pesar de que las fracturas óseas sean lesiones relativamente sencillas de tratar, el proceso completo puede requerir de 6 a 12 semanas, según la gravedad y localización de éstas, según afirma (Ross & Paulina, 2007).

Tradicionalmente las fracturas óseas graves son tratadas mediante cirugía en la cual, se inmovilizan los huesos involucrados en la fractura durante cierto tiempo hasta que éstos recuperan su morfología original. Según (Fillingham & Jacobs, 2016), en algunos casos en los que puedan surgir complicaciones como desuniones o malformaciones en la región lesionada, se recurre al empleo de injertos óseos de origen biológico, ya sean procedentes de tejido óseo sano del propio paciente (lo que se denomina autoinjerto) o de un donante vivo o cadavérico (denominándose aloinjerto si el donante no es un gemelo genéticamente idéntico). Estos injertos deben presentar osteoconductividad, que es la capacidad de atraer y hospedar pasivamente células madre mesenquimales en su superficie, sirviendo de soporte físico para éstas, y osteoinductividad; que es la capacidad de inducir la diferenciación de estas células a osteoblastos y condroblastos viables que iniciarán el proceso de formación de nuevo tejido óseo, denominado osteogénesis. Sin embargo, según (Ballester Alfaro & Sueiro Fernández, 2017, págs. 18-19), los injertos óseos tradicionales presentan varias limitaciones. En el caso de los autoinjertos, requerirían cirugía adicional en el paciente, aparecería un aumento de la morbilidad en la zona dadora (que suele corresponder a la cresta iliaca), presentarían escasa actividad como soporte mecánico y se observarían también limitaciones en cuanto a la cantidad disponible y accesible en el paciente. En el caso de los aloinjertos, las propiedades biológicas y mecánicas se verían afectadas presentando escasa actividad osteoinductiva. Además, se ha descrito actividad inmunogénica en este tipo de injertos, así como un aumento en la probabilidad de transmisión de infecciones y un alto coste. Finalmente, cabe destacar que existe la alternativa de emplear injertos procedentes de donantes animales llamados xeroinjertos. Según (Naohiro & Jupiter, 2015), estos injertos, aunque presentan un coste muchísimo menor debido a la abundancia de donantes animales (especialmente donantes bovinos), presentan una inmunogenicidad más alta que los injertos procedentes de donantes humanos, además de requerir de procesos más largos y laboriosos de esterilización que reducen significativamente las capacidades osteoinductivas.

Durante los últimos años, el diseño de biomateriales híbridos con actividad bioactiva inductores de regeneración del tejido óseo abre una nueva ventana al tratamiento de fracturas, pudiendo mejorar y acortar en el tiempo el proceso regenerativo tras un implante de estos materiales en la zona lesionada. Tal y como afirma (Przekora, 2019), el diseño de andamios o “scaffolds” (estructuras tridimensionales sintéticas que sirven de almacén para la adhesión de osteoblastos e induce procesos de osteoinducción y osteogénesis) biocompatibles permitiría mejorar después de un implante de éstos la regeneración del tejido, siendo los scaffolds óptimos aquellos que son fácilmente manipulables en cirugía y que presentan propiedades mecánicas

ajustadas a la localización de la lesión. Estos scaffolds suelen diseñarse atendiendo a las composiciones tisulares del hueso, componiéndose de materiales poliméricos tales como quitosano, ácido hialurónico, fibrina, alginato, colágeno etc. Asociados a materiales cerámicos como la Hap. Estos scaffolds, al igual que los injertos óseos, deben permitir la adhesión y proliferación celular en su interior, presentando osteoconductividad y osteoinductividad. Según (Piergiorgio, y otros, 2012), la adhesión y proliferación celular depende directamente de la arquitectura tridimensional de los scaffolds, así como de la presencia de una estructura porosa que permita la diferenciación funcional de las células y defina la forma final del hueso.

4.3. Utilización de aerogels mesoporosos basados en sílice/quitosano como scaffolds biocompatibles.

Recientemente se ha planteado la posibilidad de emplear scaffolds con base de sílice y quitosano (CS) (Apéndice A) como inductores de regeneración del tejido óseo. Estos scaffolds según un estudio de (Reyes Peces, y otros, 2020), presentan propiedades químicas y mecánicas muy versátiles, resultando ser además biocompatibles y biodegradables. La sílice de estos scaffolds juega un papel fundamental en el proceso biomineralización, ya que puede formar pequeños núcleos de crecimiento alrededor de los cuales se pueden formar cristales de HAp. Además, su capacidad para generar superficies mesoporosas lo hace ideal para este propósito. También hay que tener en cuenta que la red sílice es capaz de formar interacciones covalentes con el CS si se emplea el método sol-gel como método de síntesis, gracias a los grupos amino primarios e hidroxilo que presenta este polímero. Estas interacciones se ven favorecidas por la acción de agentes de entrecruzamiento, los cuales permiten formar enlaces fuertes entre el CS y la red de sílice en nanoescala.

Según (Reyes Peces, y otros, 2020), uno de los agentes de entrecruzamiento más eficaces propuestos es el 3-glicidoxipropil-trimetoxisilano (GPTMS) (Apéndice A), el cual forma uniones con el CS en disolución acuosa ácida mediante el ataque nucleofílico de la amina primaria del CS al grupo epóxido del GPTMS, mediante la condensación de los grupos silano del GPTMS con los grupos hidroxilo del CS, y mediante el ataque nucleofílico de los grupos hidroxilo del CS al grupo epóxido del GPTMS. (fig. 3).

Un estudio publicado por (Wang, y otros, 2015) plantea emplear tetraetilortosilicato (TEOS) (Apéndice A) como fuente de sílice, ya que en un proceso de síntesis sol-gel, los grupos -Si-OH libres del GPTMS unido al CS pueden condensar con los grupos -Si-OH del TEOS hidrolizado, formando así un gel híbrido que tras su posterior secado formará un aerogel monolítico que podría emplearse como scaffold bioactivo.

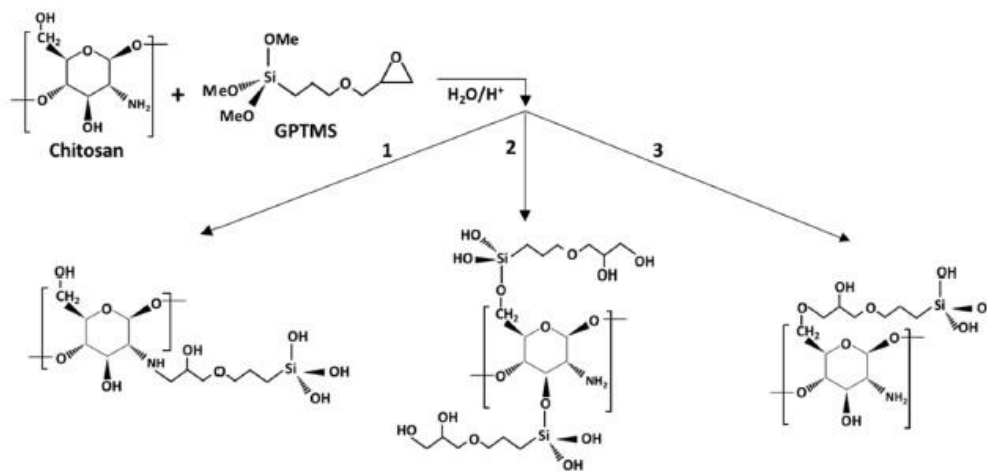


Figura 3: Diferentes rutas de unión entre el quitosano y el GPTMS: En la ruta 1 se produce el ataque nucleofílico del grupo amino primario del quitosano al grupo epóxido del GPTMS. En la ruta 2 se produce la condensación entre los grupos silano e hidroxilo del GPTMS y el quitosano respectivamente y en la ruta 3 se produce el ataque nucleofílico al grupo epóxido de los grupos hidroxilo del quitosano.

(Fuente: Reyes Peces, M. V., Pérez Moreno, A., de los Santos, D., Mesa Díaz, M., Pinaglia Tobaruela, G., Vilches Pérez, I., . . . Piñero, M. (2020). Chitosan-GPTMS-Silica Hybrid Mesoporous Aerogels for Bone Tissue Engineering. *Polymers*(12).)

En cuanto a la composición de CS que deberían presentar estos aerogeles, hay evidencias, según un artículo publicado por (Pérez Moreno, y otros, 2020), de que las propiedades mecánicas de los aerogeles son dependientes de la concentración en peso de CS en éstos, especialmente la rigidez de los aerogeles, medida con el módulo de Young (E). El módulo de Young según (Montes, Cuevas, & Cintas, 2014, pág. 359) mide la rigidez de un material y se define como el cociente entre el esfuerzo ingenieril sometido a un material (s) en un ensayo uniaxial y la deformación ingenieril que sufre dicho material (e) en dicho ensayo en la región de deformación elástica del material. En dicha región los valores de las variables ingenieriles y reales son prácticamente los mismos, por lo que definiremos el módulo de Young en función de las variables reales. (Ver ecuación 1).

$$E = \frac{s}{e} \cong \frac{\sigma}{\varepsilon}$$

Ecuación 1. Expresión del módulo de Young en la región elástica de deformación, en la que se muestran las relaciones entre el esfuerzo ingenieril (s) y real (σ) y la deformación ingenieril (e) y real (ε).

El módulo de Young de los aerogeles tiende a reducirse con un incremento de la concentración de CS. Para una concentración de CS del 1,67% en peso con respecto a la sílice el

módulo de Young medido tiene un valor de 2.61 Mpa, mientras que para un 6.53% en peso, el valor del módulo de Young presenta una caída hasta los 0.95 Mpa. Para una concentración de CS del 10.29% de CS, la caída del valor del módulo de Young es aún mayor, llegando hasta los 0.72 Mpa.

Esta caída en el valor de E sugiere una disminución en la interconexión entre los poros del aerogel y la presencia de poros de menor diámetro, los cuales están directamente relacionados con la concentración de CS.

Tal y como se trató anteriormente, la presencia de una estructura porosa en estos aerogeles se encuentra ligada a la capacidad de éste para generar scaffolds bioactivos. Según (Piergiorgio, y otros, 2012), el diámetro óptimo de poro en un scaffold empleado en regeneración ósea debe encontrarse entre los 100-400 μ m para que permitan el paso de células osteoprogenitoras al seno del material, sin embargo, el diámetro de poro de los aerogeles estudiados por (Pérez Moreno, y otros, 2020) oscila entre los 5-100nm por lo que son demasiado pequeños como para permitir el paso de células al seno de estos aerogeles y sólo permitirían un crecimiento en superficie.

A pesar de este hecho, un artículo publicado por (Lamers, y otros, 2010) revela que la presencia de un biomaterial con una morfología de escala nanométrica promueve la diferenciación celular a un fenotipo osteoblástico. Además, según (Boccardi, y otros, 2015), la estructura mesoporosa de los scaffolds permitiría la acumulación de fármacos administrados durante el proceso de tratamiento del tejido en los intersticios del scaffold, permitiendo la posterior regulación de la liberación de dicho fármaco mediante la funcionalización de los grupos silanol de la sílice y el ajuste del tamaño de poro. Esto posibilitaría la modulación y el control de la farmacocinética del fármaco, ajustándola a las necesidades del paciente.

Por todos estos factores, se cree que al sintetizar un scaffold de sílice-CS con una concentración de CS superior a las planteadas por (Pérez Moreno, y otros, 2020), se obtendría una estructura mesoporosa adecuada para inducir la regeneración del tejido óseo, permitiendo el crecimiento de osteoblastos en su superficie y sin renunciar a las propiedades farmacocinéticas que presentan los scaffolds de este tamaño de poro.

5. Objetivos e hipótesis.

En este trabajo se pretende sintetizar y caracterizar mecánica y estructuralmente un aerogel mesoporoso compuesto por sílice y CS al 20% en peso con respecto a la sílice empleando el método sol-gel, así como evaluar su biocompatibilidad con osteoblastos en cultivo primario y su bioactividad *in vitro* mediante inmersión en fluido corporal simulado.

Como hipótesis se plantean:

- 1) Los aerogeles híbridos de sílice y CS podrían presentar una estructura mesoporosa de alta superficie específica a esa concentración.
- 2) La estructura química de los aerogeles estaría formada por un entrelazamiento químico entre el CS y la red de sílice siguiendo una o varias de las rutas de unión descritas en bibliografía
- 3) Los aerogeles a esa concentración de CS podrían formar un scaffold bioactivo que permita la proliferación celular en superficie de osteoblastos.
- 4) Los aerogeles a esa concentración de CS serían biocompatibles con células osteoblásticas en cultivo.
- 5) Las propiedades mecánicas de estos aerogeles podrían ser compatibles con la composición química de este tipo de geles y adecuadas para su aplicabilidad clínica.
- 6) La matriz de sílice presentaría la capacidad de biodegradarse tras la cirugía.
- 7) Los aerogeles propuestos podrían servir de alternativa al empleo de injertos óseos de origen biológico en cirugía de fracturas óseas de considerable gravedad.

Para llevar a cabo estos objetivos y responder a las hipótesis planteadas, se harán uso las siguientes técnicas experimentales:

- Análisis por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier.
- Análisis de fisisorción de nitrógeno.
- Ensayos de compresión uniaxial.
- Análisis dinámico-mecánico.
- Ensayo de Kokubo con inmersión en fluido corporal simulado.
- Ensayo Live/Dead en cultivos celulares osteoblásticos.
- Análisis por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente.

6. Metodología, resultados y discusión.

6.1. Síntesis de los aerogeles.

El proceso de síntesis de los aerogeles de sílice-CS al 20% en peso (fig. 4) se realizó mediante el método sol-gel, el cual requiere de la gelificación de una disolución acuosa de CS ($2.0 \cdot 10^{-3}$ g/L) en ácido acético 0.5M mediante su interacción con un sol de TEOS prehidrolizado.

Para la preparación de la disolución de CS se disolvió 1g de CS low molecular weight obtenido en la casa comercial ALDRICH® en 50mL de ácido acético 0.5M, procedente de la dilución de una disolución comercial de ácido acético al 99.8% obtenido de la casa comercial

SCHARLAU®. Una vez disuelto se añadió a la disolución 2mL de GPTMS $\geq 98\%$ obtenido de la casa comercial ALDRICH®. La disolución resultante permaneció 1h en agitación.

Paralelamente se realizó la hidrólisis de 15mL de TEOS $>99\%$ obtenido de ALFA-AESAR® bajo ultrasonidos al 40% de la potencia máxima del equipo durante 3 minutos, aplicando durante todo el proceso una potencia total de 0.25KJ/cm^3 (el 40 % de la potencia máxima del equipo). Para este proceso se adicionaron 4.9 mL de ácido clorhídrico 0,1M procedente de la dilución de una disolución comercial de ácido clorhídrico al 37% obtenido de AppliChem® a la disolución de TEOS.

Finalmente se hicieron reaccionar 40 mL de la disolución de CS con toda la disolución de TEOS prehidrolizado, transcurriendo la reacción en agitación durante 30 minutos. Tras la gelificación, se vertió la disolución resultante en moldes cilíndricos que se cerraron herméticamente y se introdujeron en un ambiente a 50°C durante 10 días para permitir la formación de los scaffolds. Transcurrido ese tiempo se desmoldaron los scaffolds y se sumergieron en etanol absoluto (99.5%) de la casa comercial AppliChem® con el objetivo de retirar los disolventes acuosos que pudieran permanecer en el interior de los scaffolds. Éstos permanecieron en etanol en un ambiente a 50°C durante 5 días más, de forma que cada día el etanol se sustituía por etanol nuevo.

Tras la síntesis de los scaffolds, éstos debieron secarse empleando CO_2 supercrítico para que adoptasen la forma de aerogeles. Para ello, los scaffolds se depositaron en el autoclave de un equipo de secado (fig. 6) conformado por un baño termostático y un circuito de agua cerrado, utilizado para regular la temperatura interna del autoclave y una fuente de CO_2 que en este caso es una bala de CO_2 de 50L con sonda. Las entradas y salidas del autoclave se encuentran controladas mediante válvulas manuales. En el interior del autoclave se añadieron además 150mL de etanol de forma que éste cubriera todos los scaffolds. Tras esto, se disminuyó la temperatura del autoclave hasta los 4°C y se inyectó CO_2 procedente de la fuente. De manera controlada se abrió la válvula de salida del autoclave de forma que se purgara el etanol de los scaffolds y se sustituye por CO_2 en estado líquido. A continuación, con el autoclave cerrado, se aumentó la temperatura del autoclave hasta los 40°C lo que produjo un aumento de la presión de éste hasta los 100 bar llevando el CO_2 a estado supercrítico. Tras 15 minutos en estas condiciones se liberó lentamente el CO_2 del autoclave. Tras este proceso los scaffolds, ya formando aerogeles, se extrajeron del autoclave. El esquema de síntesis de los aerogeles se incluye a continuación. (fig. 5)

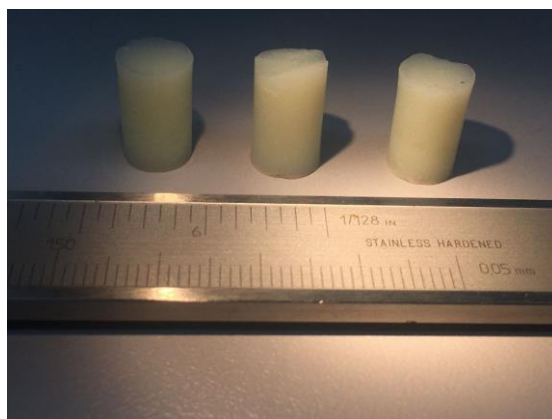


Figura 4: Vista frontal de los aerogeles sintetizados. En la figura se incluye una escala en pulgadas y en milímetros que muestra el tamaño relativo de los aerogeles.

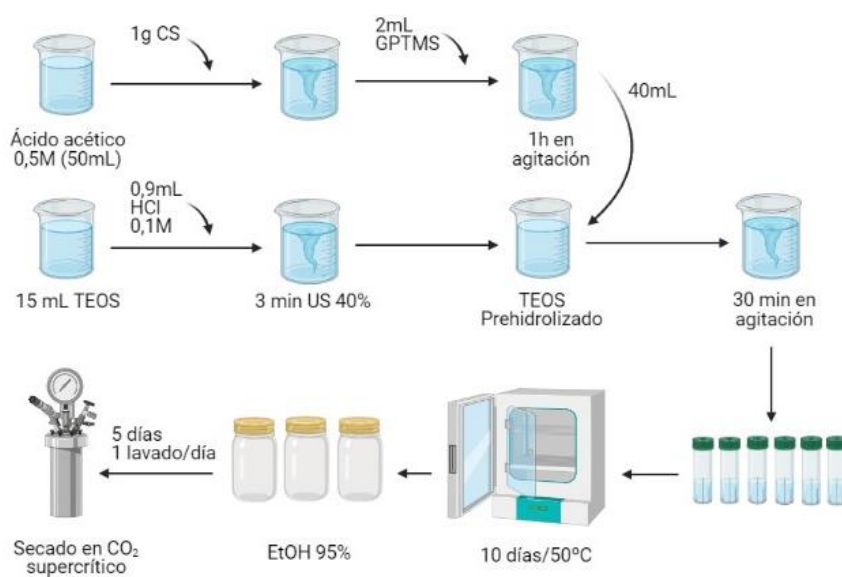


Figura 5: Esquema de síntesis de los aerogeles

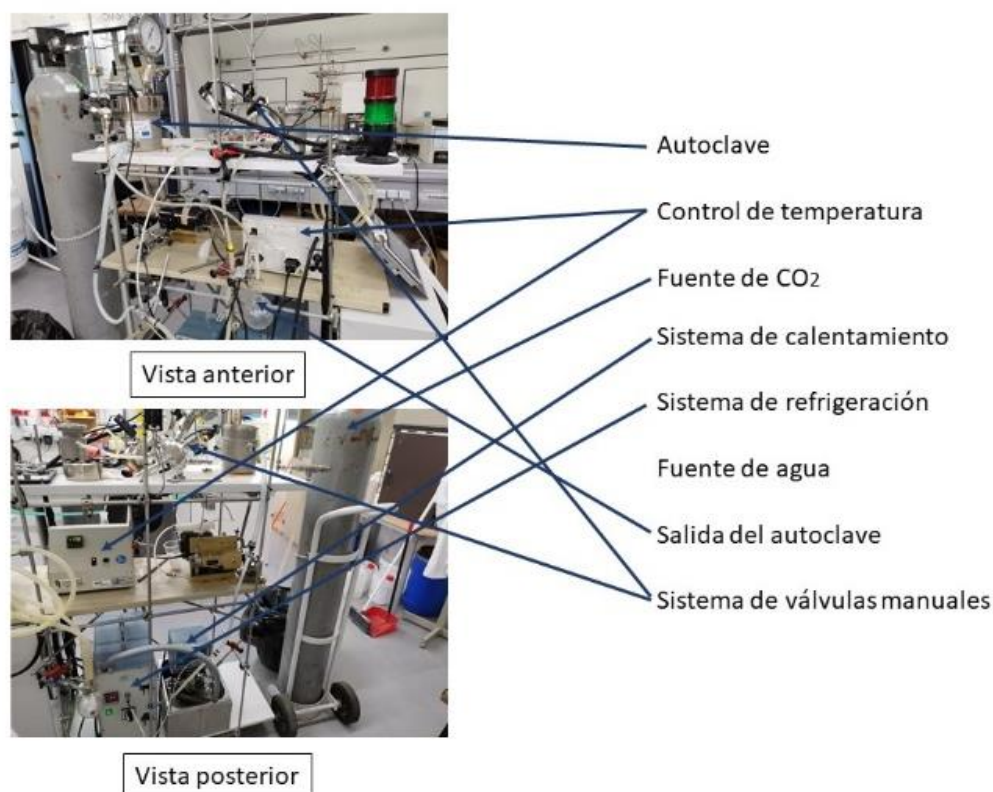


Figura 6: Esquema del equipo de secado empleado para la síntesis de los aerogeles en el que se indican sus elementos constituyentes.

Una vez finalizada la síntesis de los aerogeles se determinó la composición elemental Carbono-Nitrógeno de éstos, y se comparó con la composición elemental de una muestra pura de CS, empleando para ello el equipo Elemental Analyzer de EuroVector® modelo Euro EA 3024 y el software Callidus Software v. 5. 1. Este análisis se realizó por duplicado, y tiene como objetivo calcular la composición real de CS de los aerogeles sintetizados. Los resultados del análisis elemental (Tabla 1.), muestran que la composición real de CS en los aerogeles es del 9.658%.

Teniendo en cuenta estos resultados, podemos observar que, a pesar de haber realizado el proceso de síntesis de forma que los aerogeles resultantes presentasen una composición teórica de CS del 20% en peso, más del 50% del quitosano añadido no pasó a formar parte de la red de sílice. Esto podría deberse a un proceso de degradación del quitosano durante su disolución en ácido acético, o bien a un rendimiento limitado en la reacción del CS con el GPTMS, que resultó en la elución de gran parte del CS en el proceso de secado. A pesar de esto, el valor resultante concuerda con las concentraciones de CS más altas observadas en bibliografía. (Reyes Peces, y otros, 2020) (Pérez Moreno, y otros, 2020).

Tabla 1. *Análisis elemental Carbono-Nitrógeno de los aerogeles sintetizados, comparados con la composición elemental Carbono-Nitrógeno del CS puro.*

Muestra analizada	Peso medio (mg)	(N)% media	(C)% media
CS	7.860±0.095	7.802±0.010	39.020±0.024
Aerogel	2.532±0.061	0.754±0.052	12.624±0.021
Composición de CS en los aerogeles	9.658±0.052%		

6.2. Estudio de la estructura química y las propiedades texturales.

Una vez realizada la síntesis de los aerogeles, se procedió a efectuar la caracterización de la estructura química de éstos, así como un estudio de su estructura física superficial; ya que de estas propiedades van a depender a posteriori las propiedades mecánicas y biológicas del material las cuales son determinantes en su bioactividad y en su capacidad para ser empleados en cirugía.

Para el estudio de su estructura química se empleó un análisis de Espectroscopía de Absorción Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) (Apéndice A), que es una técnica basada, según (Klein, Aparicio, & Jitianu, 2018, pág. 1123) en la absorción de determinadas frecuencias de radiación infrarroja según los diferentes modos de vibración que presenten los grupos funcionales existentes en las moléculas de la muestra o de sus cristales. Esta técnica puede emplearse tanto en el rango de longitudes de onda correspondiente a los infrarrojos cercanos (2500-700 nm), el rango correspondiente a los infrarrojos medios, (400-4000 cm⁻¹), como en el rango de los infrarrojos lejanos (10-400 cm⁻¹).

En el análisis FTIR (realizado con un espectrofotómetro Bruker Tensor 37) de los aerogeles se empleó una proporción 1/8 de muestra pulverizada del aerogel, en combinación con bromuro de potasio al 98% de riqueza, adquirido de la casa comercial PANREAK®. Todo el conjunto se presionó a 6 toneladas/cm² de presión durante 20 segundos para formar una pastilla. Antes del análisis, la muestra se almacenó durante 24 horas a una temperatura de 60°C. Para éste, se realizaron cien barridos de frecuencias sobre la pastilla que, expresado como número de onda (ver ecuación 2) va desde los 400 cm⁻¹ hasta los 4000 cm⁻¹, por lo que estaríamos en el rango de los infrarrojos medios. La resolución del equipo en este proceso de barrido fue de 4 cm⁻¹.

$$c = \lambda f = \frac{2\pi}{k} f$$

Ecuación 2. *Relaciones existentes entre la velocidad de las radiaciones electromagnéticas en el vacío c , su frecuencia (f), longitud de onda (λ) y su número de onda (k).*

El espectro de absorción del aerogel (fig. 7) revela tres bandas de absorción de significativa relevancia. En ellas, según (Connell, y otros, 2014) se distinguen dos bandas características de los enlaces existentes en la red de sílice entre los átomos de silicio y los grupos oxigenados, la primera banda (dada a un número de onda de 935 cm^{-1}) corresponde con la presencia de enlaces Si-OH, característicos de las moléculas de TEOS y GPTMS que no enlazan con el resto de la red de sílice del aerogel. La segunda banda importante, que además presenta una intensidad considerable (dada a 1086 cm^{-1}) corresponde con la presencia de enlaces Si-O-Si, los cuales confirman la existencia de la red de sílice en el aerogel, formada por las moléculas de TEOS y GPTMS entrelazadas.

Finalmente se observa una banda de especial interés en el espectro, que confirman la presencia de enlaces entre el CS orgánico y la red de sílice inorgánica a través del ataque nucleofílico de la amina primaria del CS al epóxido del GPTMS. Esta banda, de muy baja intensidad, y dada a 1514 cm^{-1} corresponde con la presencia de enlaces N-H y característico de las aminas primarias. Debido a que la intensidad de esta banda es muy baja, podemos deducir que el CS está reaccionando principalmente con el GPTMS siguiendo el mecanismo descrito anteriormente, confirmándose así el entrecruzamiento entre el CS y la red de sílice. Estudios previos (Reyes Peces, y otros, 2020) además, confirman que la intensidad de esta banda aumenta a menores concentraciones de CS.

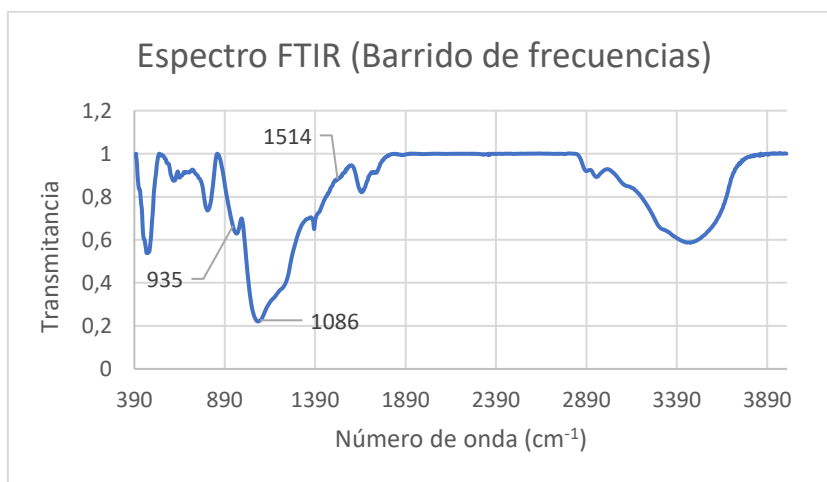


Figura 7: Espectro de absorción de infrarrojos con transformada de Fourier de los aerogeles estudiados.

Para la caracterización de las propiedades texturales de los aerogeles, consistente en calcular su superficie específica y determinar la distribución del tamaño de poro, se empleó un análisis de fisisorción de nitrógeno. Según (Reyes Peces, 2018, págs. 23-25) esta técnica se basa

en la medición de la presión de equilibrio existente en un sistema sólido (en este caso una muestra de masa conocida de los aerogeles) cuando se añade gradualmente un flujo de nitrógeno, procedente de la evaporación de un depósito de nitrógeno líquido, a presión conocida en un recipiente cerrado. En este proceso, el nitrógeno será adsorbido por el aerogel hasta alcanzar la presión de equilibrio. Si se mide esta presión de equilibrio y se representa en función de la cantidad molar de nitrógeno suministrada, la cual es obtenida a partir del volumen de nitrógeno suministrado según la ley de los gases ideales, obtendremos la isoterma de adsorción.

Una vez finalizado este proceso, se produce la desorción del nitrógeno por parte de los aerogeles. Si se representa de nuevo la presión de equilibrio en función de la cantidad molar de nitrógeno que se está perdiendo en este momento, obtendremos la isoterma de desorción. Ambas isotermas pueden diferir entre sí, dando lugar a diferentes ciclos de histéresis e isotermas clasificados por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) (Apéndice A), cuya tipología es característica de cada tipo de estructura (fig. 8).

Para el cálculo de la superficie específica se empleará el método de Bruanuer, Emmet y Teller (BET) (Apéndice A), basado en el modelo de Langmuir para la adsorción, el cual postula según (Sandoval Ibarra, López Cervantes, & García Fadrique, 2015) la formación de una monocapa de moléculas adsorbidas en la superficie adsorbente, de forma que los sitios susceptibles de alojar una molécula de adsorbato son limitados y tienen la misma probabilidad de hacerlo.

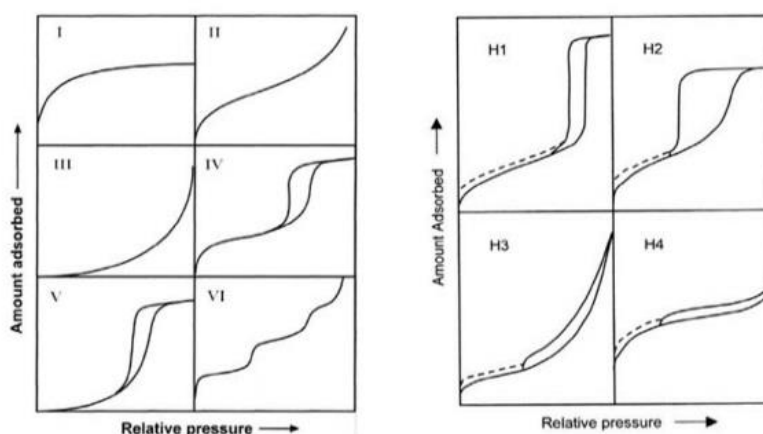


Figura 8: Clasificación realizada por la IUPAC de las isotermas y de los ciclos de histéresis posibles de obtener en un ensayo de fisisorción. Las isotermas se encuentran a la derecha y los ciclos de histéresis a la izquierda.

Fuente: Reyes Peces, M. V. (2018). Síntesis y caracterización de aerogeles híbridos SiO₂/dióxido de dimetilsilano para la eliminación de solventes orgánicos del agua por absorción selectiva. Trabajo de Fin de Máster, (pág. 24).

El modelo también asume que no existen interacciones entre las moléculas de adsorbato y que los procesos de adsorción y desorción se encuentran en equilibrio dinámico. Si representamos la concentración de moléculas adsorbidas como Γ , y dado que la superficie es finita, esta concentración alcanzará un valor máximo de saturación, representado como Γ_s . La relación entre ambas concentraciones (ver ecuación 3) define el grado de recubrimiento de la superficie (θ). (fig. 9).

$$\theta = \frac{\Gamma}{\Gamma_s}$$

Ecuación 3. Grado de recubrimiento de una superficie adsorbente (θ) y su relación con la concentración de moléculas adsorbidas (Γ) y su concentración de saturación (Γ_s).

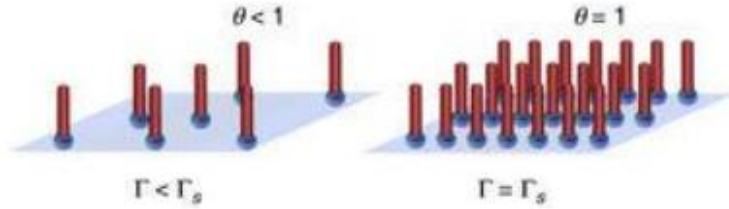


Figura 9: Esquema básico en el que se basa el modelo de Langmuir. En el se representan dos superficies con diferentes grados de recubrimiento. La superficie de la izquierda ha alcanzado el equilibrio sin llegar a saturarse y su grado de recubrimiento es por tanto inferior a 1. La de la derecha está saturada y su grado de recubrimiento es igual a 1.

(Fuente: Sandoval Ibarra, F. D., López Cervantes, J. L., & García Fadrique, J. (2015). Ecuación de Langmuir en líquidos simples y tensoactivos. *Educación Química*, 26, 307-313.)

Partiendo de estos postulados se construyen las isothermas de Langmuir (ver ecuación 4). El método BET, a diferencia del modelo propuesto por Langmuir, considera que la adsorción puede darse en multicapa, además, teniendo en cuenta la teoría cinética de los gases, la ecuación que describe la adsorción del nitrógeno en los aerogeles según este método es diferente. (ver ecuación 5).

$$\theta = \frac{\beta x}{1 + \beta x}; \quad \beta = \frac{k_{ad}}{k_{de}}$$

Ecuación 4. Isotherma de Langmuir, en la que se relacionan el grado de recubrimiento (θ), con la fracción molar de adsorbato en disolución (x) con la relación (β) entre las constantes cinéticas de adsorción (k_{ad}) y desorción (k_{de}).

$$\frac{P}{V(P_0 - P)} = \frac{1}{C \cdot V_m} + \frac{C - 1}{C \cdot V_m} \cdot \frac{P}{P_0}$$

Ecuación 5. Ecuación del método BET, que relaciona el volumen adsorbido (V) con la presión de equilibrio (P), la presión de saturación (P_0) y el volumen de la monocapa formada por el adsorbato (V_m). C es una constante dependiente de la energía de adsorción y la temperatura.

Conociendo el volumen de la monocapa formada por el adsorbato se puede conocer la superficie constituida por la especie adsorbente susceptible de alojar moléculas de adsorbato, y, por tanto, en el caso la muestra de los aerogeles, conocer su superficie específica, ya que medimos su masa previamente. (Ver ecuación 6).

$$S_{BET} = \frac{A N V_m}{M}$$

Ecuación 6. Ecuación que relaciona el área superficial del adsorbente (S_{BET}) con el volumen de la monocapa formada por el adsorbato (V_m), donde A es la constante de Avogadro, N es el área ocupada por cada una de las moléculas de adsorbato y M el volumen molar del gas.

Para determinar la distribución del tamaño de poro de los aerogeles se empleó el método de Barrett, Joyner y Halenda (BJH) (Apéndice A), basado, según (Bardestani, Patience, & Kaliaguine, 2019), en el estudio de las isothermas de adsorción y desorción. Parte de la suposición de que la forma de los poros existentes en el material a estudiar es cilíndrica, y que la cantidad de adsorbato que ingresa en los poros del material se debe a la adsorción por parte de las paredes internas del poro y por la condensación capilar producida en estos poros. Teniendo esto en cuenta, se puede estimar el radio de los poros existentes en el material como la suma del grosor de la monocapa (o multicapa) (t) y del radio del menisco producido en el interior del poro (r) (fig. 10), el cual viene definido por la ecuación de Kelvin. (Ver ecuación 7).

$$\ln\left(\frac{P}{P_0}\right) = \frac{2\gamma M}{rRT}$$

Ecuación 7. Ecuación de Kelvin, que relaciona la presión relativa en equilibrio con el menisco, (P/P_0) con el radio del menisco formado en el poro (r). Donde (γ) es la tensión superficial del adsorbato en disolución, (M) es el volumen molar del gas, (R), la constante universal de los gases, y (T) es la temperatura.

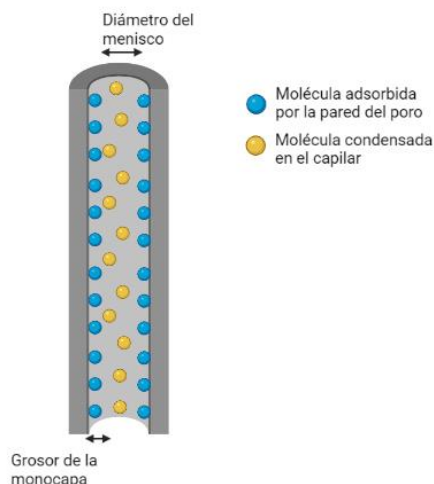


Figura 10: Esquema del proceso de adsorción producido en los poros del material. En él podemos ver que el radio del poro corresponde a la suma del grosor de la monocapa formada por las moléculas adsorbidas por la pared, y el radio del menisco formado por las moléculas condensadas en el interior del capilar.

El estudio de fisisorción se realizó con un equipo ASAP 2010, (Micrometrics® USA). Para el proceso de análisis se pesaron 0.1073g de una muestra de aerogel pulverizado, que posteriormente se desgasificó a una temperatura de 100°C a vacío durante 2 horas, para eliminar cualquier resto de humedad que pudiera presentar la muestra adsorbida de forma previa al estudio. A continuación, se volvió a pesar la muestra para conocer el valor de masa que presenta después del proceso de desgasificación, siendo el valor resultante de 0.0936g, por lo que confirmamos que tras el proceso de desgasificación se ha perdido masa procedente de la humedad de la atmósfera adsorbidas en el material. En este momento, comenzó el análisis de fisisorción en sí, en el que, a una temperatura constante de 77K, se obtuvieron las isothermas de adsorción y desorción (fig. 11). Finalmente, a partir de modelos estándar de análisis BET y BJH, se obtuvo la superficie específica de los aerogels, y su distribución de tamaño de poro (fig. 12). Después del estudio, se volvió a pesar la muestra, resultando un valor de masa de 0.0925g, que, al ser un valor de masa cercano al obtenido después de la desgasificación, confirmamos que la desgasificación se ha efectuado correctamente y que no han ocurrido complicaciones durante el estudio. Todas las pesadas se efectuaron en un matraz cerrado herméticamente (y previamente pesado) para evitar la interacción de la muestra con la atmósfera.

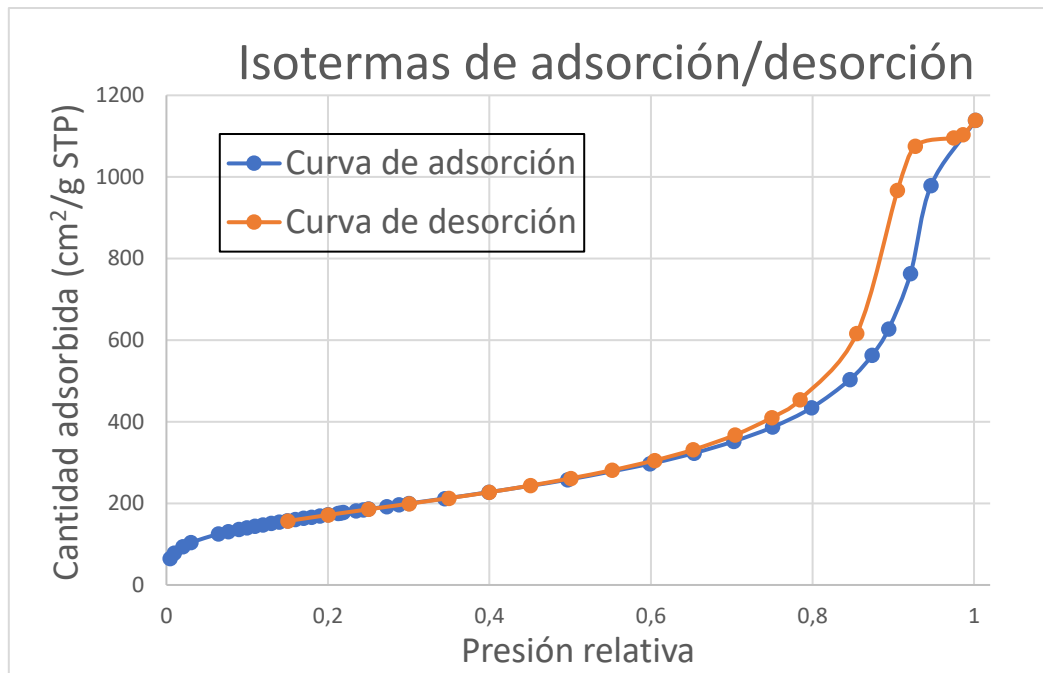


Figura 11: Isotermas de adsorción y desorción obtenidas tras el análisis de fisisorción de nitrógeno de los aerogeles.

Como podemos observar, las isotermas generadas corresponden con isotermas del grupo IV de clasificación según la IUPAC. Estas isotermas están asociadas a una estructura porosa formada por mesoporos interconectados entre sí y dan lugar a ciclos de histéresis de tipo H1 y a procesos de adsorción en multicapa.

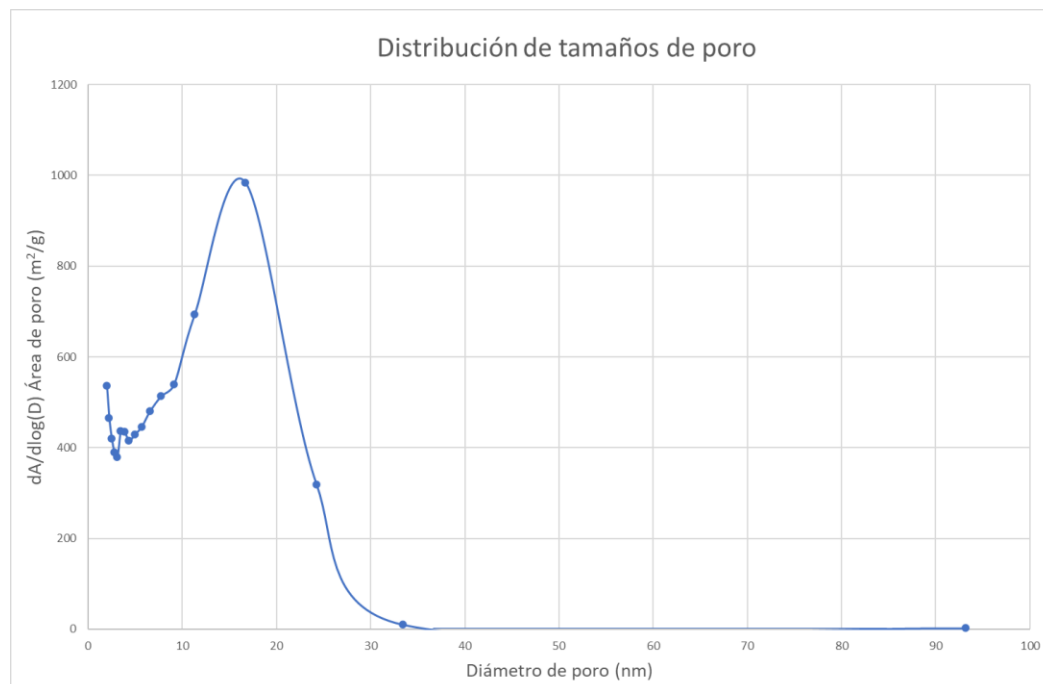


Figura 12: Distribución de tamaños de poro presentes en los aerogeles.

En la distribución de tamaños de poro, podemos determinar que existe una gran variación en el tamaño entre los poros situados en el tramo comprendido entre 0-10.00nm. El tamaño medio de poro en los aerogeles es aproximadamente de 16.67nm, para después caer drásticamente en número a medida que aumenta el tamaño de poro, hasta alcanzar un valor nulo a los 33,39nm de diámetro o superior.

Los aerogeles presentan una superficie específica de 627.80 m²/g, lo que podemos considerar como un valor característico de los aerogeles, tal y como se esperaba.

6.3. Estudio de las propiedades mecánicas y viscoelásticas.

Una vez realizada la caracterización química estructural de los aerogeles se procedió a su caracterización mecánica y viscoelástica, con el objetivo de estudiar la influencia de la estructura geométrica de los aerogeles en las propiedades mecánicas de éstos, en especial su Módulo de Young, y sus parámetros viscoelásticos. Con este fin se realizaron dos ensayos independientes: un ensayo de compresión uniaxial a diferentes velocidades de deformación para medir el Módulo de Young de los aerogeles y la influencia de la velocidad de deformación en este parámetro, y un Análisis Dinámico-Mecánico (DMA) (Apéndice A) para estudiar las propiedades viscoelásticas de los aerogeles.

Un ensayo de compresión uniaxial se basa, según (Montes, Cuevas, & Cintas, 2014, pág. 378), en la medición de la deformación de una muestra de forma y dimensiones conocidas sometida a un esfuerzo creciente de compresión también conocido. Si se representa el esfuerzo aplicado en función de la deformación relativa de la muestra, se obtendrán las curvas de Esfuerzo-Deformación, cuyo análisis proporciona información relevante sobre las propiedades mecánicas del material de la muestra y su tipología.

En nuestro caso, en estos análisis, la velocidad de carga es un parámetro imprescindible de controlar, ya que, una variación de ésta puede afectar de manera significativa a las propiedades mecánicas de la muestra a analizar. En concreto, un aumento en la velocidad de carga producirá un aumento en la velocidad de deformación de la muestra, que se define como la derivada con respecto al tiempo de la deformación sufrida por la muestra (Ver ecuación 8). Ésta se comprimirá de forma que la fase orgánica de CS absorba la energía de forma menos ordenada, oponiendo mayor resistencia a la compresión y aumentando así la rigidez de la muestra. Este aumento de rigidez se mide mediante un parámetro denominado sensibilidad a la velocidad de deformación (n), que viene definido según la ecuación siguiente. (Ver ecuación 9).

$$\dot{\varepsilon} = \frac{d\varepsilon}{dt} = \frac{1}{L_0} \cdot \frac{d\Delta L}{dt} = \frac{v}{L_0}$$

Ecuación 8. *Definición de la velocidad de deformación ($\dot{\varepsilon}$), como la derivada de la deformación sufrida por la muestra (ε) con respecto al tiempo (t). Sustituyendo la definición de la deformación ingenieril en la expresión, resulta que en este caso la velocidad de deformación se define como el cociente entre la velocidad de carga (v) y la altura inicial de la muestra (L_0)*

$$\sigma_f = k \cdot \dot{\varepsilon}^n; \quad E = A \cdot \dot{\varepsilon}^n$$

Ecuación 9. *Relación existente entre el esfuerzo máximo dado en la zona elástica de las curvas de Esfuerzo-Deformación (σ_f) y la velocidad de deformación. Donde (k) es una constante y (n) es la sensibilidad a la velocidad de deformación, que mide este aumento de rigidez. Aplicando la definición del Módulo de Young, llegamos a la ecuación de la derecha.*

En el ensayo de compresión uniaxial se analizaron seis muestras de aerogeles monolíticos de forma cilíndrica cuyas dimensiones fueron medidas empleando un calibre digital. Además, se midió la masa de estos aerogeles con el objetivo de determinar su densidad, que fue calculada matemáticamente (Ver ecuación 10).

$$\rho = \frac{m}{\pi R^2 h}$$

Ecuación 10. *Cálculo de la densidad de una muestra cilíndrica, en la que (m) es la masa de la muestra, (R), es su radio y (h) es su altura.*

Para la determinación de las curvas de Esfuerzo-Deformación se empleó un equipo AG-1 Autograph de la casa Shimadzu®, analizándose posteriormente los resultados mediante el software Trapezium2 v. 2.33. El equipo se equipó con una celda de 5kN, que ofrece una precisión de ± 20 N. La celda permaneció durante todo el ensayo. Cada muestra se midió a una velocidad de carga diferente, en un rango comprendido entre 0.10-7.50 mm/min en un ciclo de compresión-descompresión, aplicándose una fuerza máxima sobre las muestras de 150N en todos los casos. La precisión de los valores de deformación es de $\pm 1\mu\text{m}$. Los datos de los valores de masa y dimensiones, así como las diferentes velocidades de carga a las que fueron sometidas las muestras se detallan en la (Tabla 2).

Tabla 2. Dimensiones, masa y densidad de las muestras analizadas en el ensayo de compresión uniaxial, así como la velocidad de carga empleada en cada muestra.

Muestra	Altura (mm)	Diámetro (mm)	Masa (g)	Densidad (Kg/m ³)	Velocidad de carga (mm/min)
1	15.67	8.49	0.27	304.36	0.10
2	16.44	8.48	0.28	301.56	0.50
3	9.01	8.22	0.16	334.63	1.00
4	13.64	8.26	0.25	342.04	1.50
5	13.97	8.23	0.25	336.40	2.50
6	9.49	8.52	0.33	609.93	7.50

Las curvas de Esfuerzo-Deformación de las muestras anteriores se muestran a continuación (fig. 13). En ellas podemos apreciar, de forma general, la presencia de amplios ciclos de histéresis, que revelan la naturaleza viscoelástica de los aerogeles, dada por la presencia de la fase orgánica de CS en la red de sílice, capaz de absorber parte de la energía aplicada a la muestra durante el ensayo de compresión. Las muestras después del ensayo sufrieron una deformación plástica permanente, que no llegó a recuperarse.

Todo esto concuerda con la incorporación del CS a la red de sílice observada en el análisis FTIR, ya que, según (Reyes Peces, 2018, pág. 12), las muestras puras de sílice presentan un comportamiento más elástico y frágil al no contener polímeros orgánicos en su estructura.

Durante el ensayo, se observó, de forma general, un aumento progresivo del Módulo de Young de las muestras a medida que aumenta la velocidad de deformación, lo cual es esperable debido al aumento de rigidez de las muestras. El Módulo de Young toma valores comprendidos entre los 18.87-43.81 Mpa. (Tabla 3).

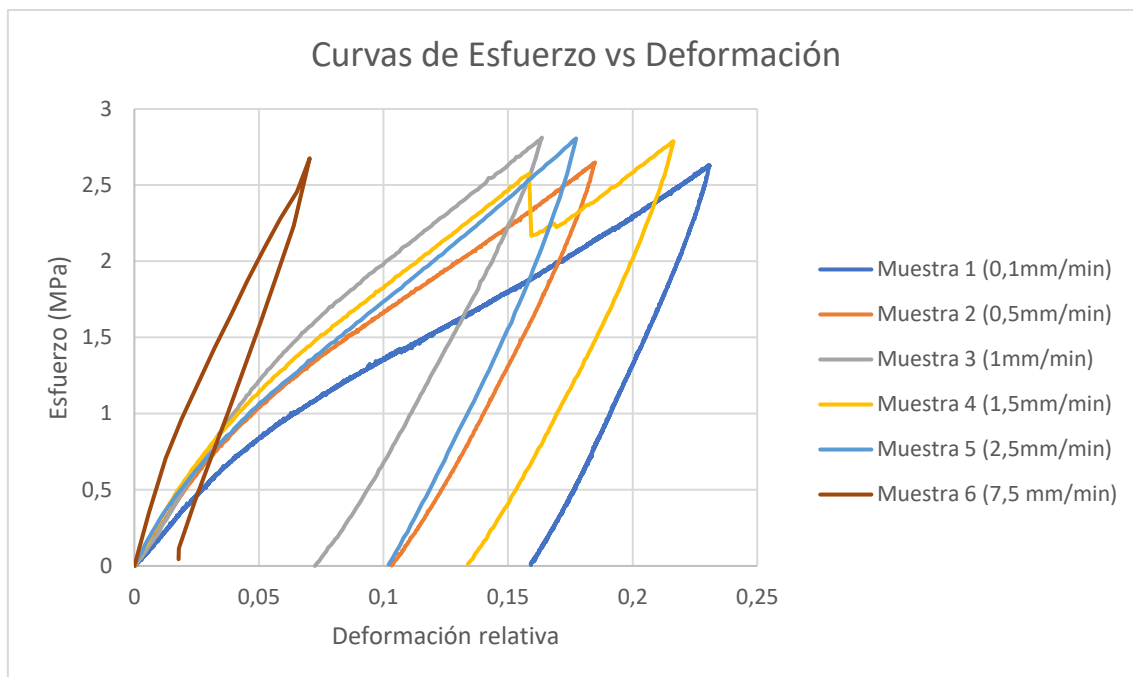


Figura 13: Curvas de Esfuerzo-Deformación de los aerogeles. En ellas se pueden observar amplios ciclos de histéresis, además de un aumento general del Módulo de Young, correspondiente con la pendiente de las curvas en su región de deformación elástica, a medida que aumenta la velocidad de deformación. (En la leyenda se muestra el valor de velocidad de carga). Finalmente cabe destacar que la muestra 4 sufrió una ruptura durante el ensayo, pero al darse en la región de deformación plástica, no afecta al cálculo del Módulo de Young.

Tabla 3. Valores del Módulo de Young medidos para cada muestra.

Muestra	Módulo de Young (Mpa)
1	18.87
2	25.23
3	25.56
4	28.58
5	26.77
6	43.81

El valor del coeficiente de sensibilidad a la velocidad de deformación de estas muestras es de 0.154; y fue calculado mediante una regresión exponencial de una representación del Módulo de Young con respecto a la velocidad de deformación de las muestras (fig.14), obteniéndose un valor de R^2 de 0.8531. El valor del coeficiente de sensibilidad a la velocidad de deformación es esperable para este tipo de muestras.

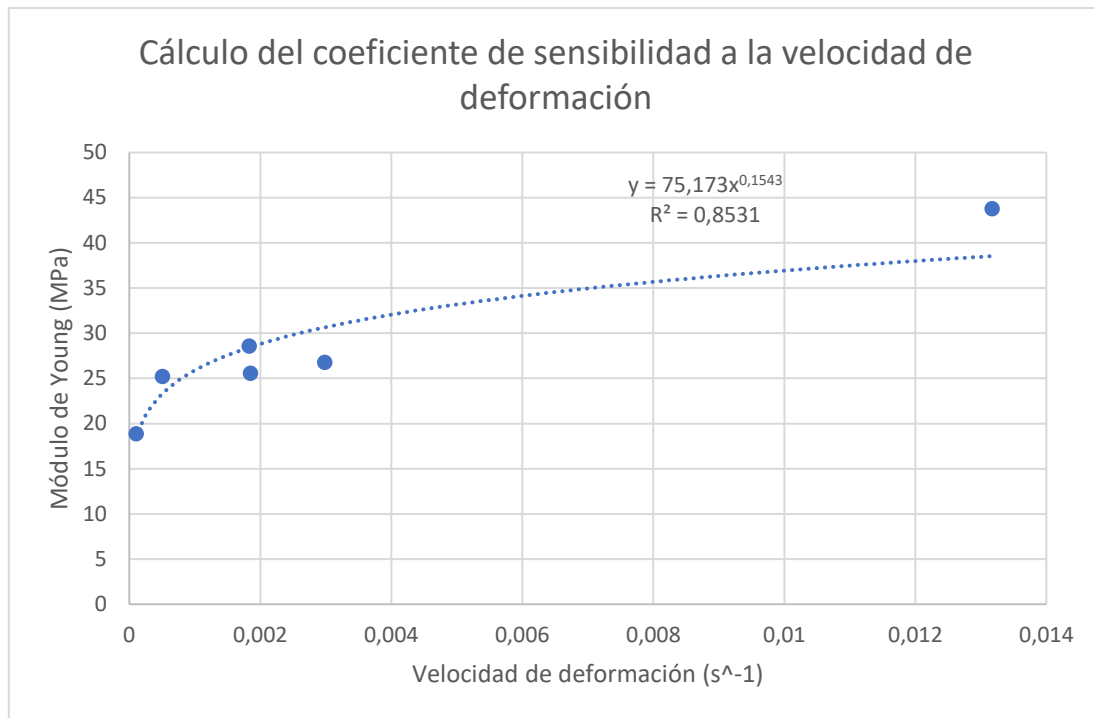


Figura 14: Representación del Módulo de Young de las muestras con respecto a su velocidad de deformación.

Tal y como hemos observado en las curvas de Esfuerzo-Deformación, las muestras presentan cierto carácter viscoelástico.

Los materiales viscoelásticos son aquellos que presentan un comportamiento reológico comprendido entre los materiales elásticos y los materiales viscosos, manifestándose en el hecho de que son capaces de deformarse plásticamente hasta cierto valor con la aplicación de un esfuerzo pequeño, para después recuperar paulatinamente sus dimensiones originales una vez cesado el esfuerzo, mediante una liberación progresiva de la energía acumulada en el proceso. En la medición de este fenómeno se basa la técnica de DMA. En ella, se aplica a la muestra un esfuerzo de compresión oscilante a una amplitud y frecuencia determinadas, mientras se registra a tiempo real la deformación sufrida por la muestra. Debido al carácter viscoelástico de la muestra, la curva del esfuerzo se desfaza un cierto ángulo (θ) con respecto a la curva de deformación. Dependiendo del valor del ángulo (θ), podemos distinguir entre materiales puramente elásticos, con un valor de $\theta=0$, materiales puramente viscosos, con un valor de $\theta=90^\circ$, y materiales viscoelásticos, con un valor de θ comprendido entre ambos valores. Atendiendo a esto, se definen dos variables fundamentales que definen el comportamiento viscoelástico de estos materiales: el Módulo de Almacenamiento (E'), que es mayor cuanto más elástico sea el comportamiento reológico del material, y el Módulo de Pérdida (E''), que es mayor cuanto más viscoso sea el comportamiento reológico. (Ver ecuación 11).

$$E' = \frac{\sigma}{\varepsilon} \cos\theta; \quad E'' = \frac{\sigma}{\varepsilon} \sin\theta$$

Ecuación 11. *Definición de los Módulos de Almacenamiento (E') y Pérdida (E''), en las que (σ) corresponde con el esfuerzo aplicado a las muestras, (ε) corresponde con la deformación, y (θ) es el ángulo de desfase. A partir de aquí se deduce que el cociente entre el Módulo de Pérdida y el Módulo de Almacenamiento corresponde con la tangente del ángulo de desfase.*

El análisis DMA se realizó empleando un equipo DMA analyzer Q800 de la casa comercial TA instruments®. El análisis se realizó a dos muestras cilíndricas de dimensiones conocidas (Tabla 4), a una temperatura constante de 37°C para imitar las condiciones fisiológicas a las que estarían sometidas las muestras en el caso de que se emplearan como sustitutos de injerto óseo, y se aplicó un esfuerzo oscilante a una amplitud constante de 10µm. Se realizó un barrido de frecuencias de oscilación, comprendidas entre 40.00 Hz y 0.10 Hz. Una de las muestras se analizó en seco y la otra muestra se sumergió en una disolución de buffer fosfato salino (PBS) (Apéndice A) durante el análisis. El equipo obtuvo una representación en escala logarítmica del Módulo de Almacenamiento, el Módulo de Pérdida, y la tangente de θ , en ambos casos (fig. 15), pudiendo analizar la influencia del medio salino en las propiedades viscoelásticas del material, lo cual es crucial si se pretende emplear estos aerogeles en cirugía.

Tabla 4. *Dimensiones de las muestras analizadas mediante DMA, así como el medio En el que se realizó el análisis.*

Muestra	Medio	Altura (mm)	Diámetro (mm)
1	Seco	7.37	8.17
2	PBS	6.82	8.12

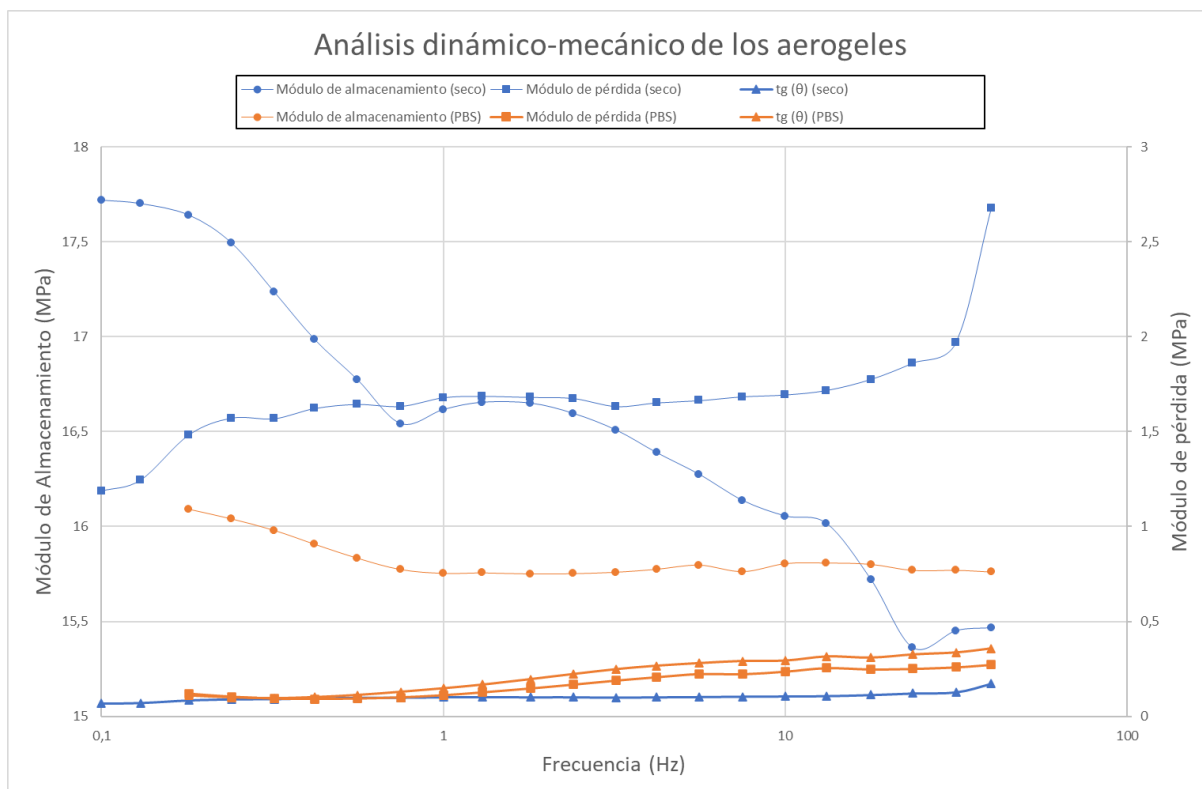


Figura 15: Representación del Módulo de almacenamiento (Círculos), el Módulo de Pérdida (Cuadrados) y la Tangente del ángulo de desfase (Triángulos) en medio seco (Azul) y en PBS (Naranja). El gráfico está representado en escala logarítmica.

Como podemos apreciar en el gráfico, los aerogeles en medio seco tienden a presentar un comportamiento más elástico a frecuencias bajas de oscilación, evidenciado por el valor tan alto que presenta el módulo de almacenamiento con respecto al de pérdida; mientras que a frecuencias altas (a partir de 1Hz) presentan un comportamiento más viscoso. Además, se puede apreciar que, en PBS los aerogeles presentan un comportamiento más uniforme, siendo similar en todo el rango de frecuencias, aunque de forma similar a los aerogeles en medio seco, con un ligero aumento del carácter viscoso con la frecuencia. Podemos afirmar que este comportamiento es más elástico que viscoso y con una considerable disminución de los Módulos de Pérdida y Almacenamiento con respecto al medio seco. Todo esto se puede explicar gracias a la gran afinidad que presenta el CS por el agua, haciendo que las muestras la absorban del medio con PBS. Esta agua atrapada en los poros de la muestra amortigua las oscilaciones y disminuye los Módulos de Almacenamiento y de Pérdida.

A efectos clínicos, esto implicaría que las propiedades viscoelásticas de los aerogeles, en el caso de estar implantados en un paciente, no se verían afectadas por los movimientos que realizara dicho paciente en el proceso de rehabilitación en caso de necesitarla, lo que es ventajoso para la terapia.

6.4. Estudio de la bioactividad *in vitro*.

Una vez realizada la caracterización mecánica de los aerogeles, es necesario realizar un estudio de bioactividad para demostrar si los aerogeles presentan propiedades osteoconductoras que permitan el proceso de osteogénesis una vez implantados en una fractura grave. Para ello, se realizó un ensayo de Kokubo sobre los aerogeles.

Este ensayo se basa en simular *in vitro* el proceso natural de osificación, en el que, según (Geneser, Qvortrup, Trandum-Jensen, Christensen, & Bruel, 2012, págs. 270-272), la matriz orgánica sintetizada por los osteoblastos sufre un proceso de mineralización, en el que se acumulan depósitos de Hap. En el hueso este proceso puede ocurrir en varios puntos simultáneamente, denominándose el primer punto en iniciar el proceso como centro de osificación primario y los posteriores, centros de osificación secundarios. Posteriormente, estos puntos se fusionan rápidamente para formar un centro de osificación común a partir del cual se origina el resto del tejido óseo. En este proceso, los osteoblastos son capaces de adherirse al tejido óseo trabecular ya mineralizado y formar una capa simple de células, para después secretar más matriz ósea que se mineraliza posteriormente. (fig. 16).

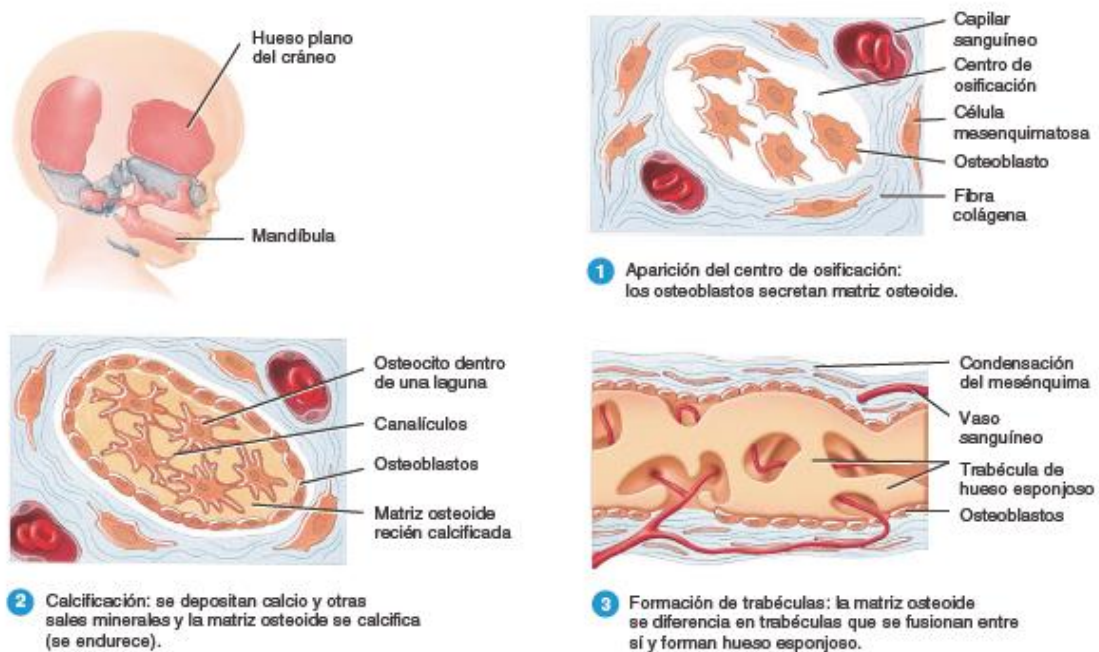


Figura 16: Esquema del proceso de osificación de un hueso humano. En él los osteoblastos secretan matriz orgánica en un centro de osificación (1), que posteriormente se mineraliza (2) y forma las trabéculas del tejido óseo esponjoso (3).

(Fuente: <https://userscontent2.emaze.com/images/844616e6-b102-42e7-9bb5-1d52691c491e/3d2ab503a18e6fc00cd4faab786f68cf.png>)

Para simular el proceso de osificación, se sumergió una muestra de 0.094g de los aerogeles, que harán las veces de matriz orgánica, en 30mL de una disolución de fluido corporal simulado (SBF) (Apéndice A), cuya composición, detallada por (Ravarian, y otros, 2010), se muestra a continuación (Tabla 5). El conjunto se mantiene en un ambiente a temperatura estable de 37°C. Este proceso se repitió con cuatro muestras independientes, cada una de las cuales permaneció un tiempo diferente en inmersión; en concreto pasaron una semana, dos semanas, tres semanas y un mes respectivamente. Independientemente de la muestra, el SBF se fue renovando semanalmente, para mantener su composición más o menos estable a lo largo del tiempo.

Tabla 5. *Composición de iones del SBF comparada con la composición de iones del plasma.*

Ión	Concentración en plasma (mmol/L)	Concentración en SBF (mmol/L)
Sodio (Na ⁺)	142,0	142,0
Potasio (K ⁺)	5,0	5,0
Magnesio (Mg ²⁺)	1,5	1,5
Calcio (Ca ²⁺)	2,5	2,5
Cloruro (Cl ⁻)	103,0	147,8
Bicarbonato (HCO ₃ ⁻)	27,0	4,2
Bifosfato (HPO ₄ ²⁻)	1,0	1,0
Sulfato (SO ₄ ²⁻)	0,5	0,5

Una vez transcurrido el tiempo en el que las muestras permanecían en inmersión, se comprobó si la matriz sufrió un proceso de mineralización en el que se acumularon depósitos de Hap. La bioactividad de las muestras será mayor a mayor superficie recubierta por Hap, definiéndose así, según (Chen & Thouas, 2015, pág. 219), el índice de bioactividad (I_B) (Ecuación 12).

$$I_B = \frac{100}{t_{0,5}}$$

Ecuación 12. *Definición del índice de bioactividad (I_B), en el que ($t_{0,5}$) es el tiempo necesario para que la mitad de la superficie del biomaterial se haya mineralizado.*

Para comprobar esto, las muestras fueron lavadas con agua destilada para eliminar cualquier resto de cloruro de sodio que hubiera podido depositarse en su superficie, para más tarde preparar las muestras para microscopía electrónica de barrido (SEM) (Apéndice A). De esta forma, las muestras se metalizaron con un recubrimiento de partículas de oro que evitará que las éstas se

carguen durante la técnica de microscopía, dando así una imagen más nítida. La metalización se realizó con un equipo Cressington 208HR.

En la observación microscópica se tomaron tres imágenes por muestra, a un aumento de 80X, 1300X, y 5000X respectivamente, además de un espectro de dispersión de energía de cada región observada, que nos permite conocer el ratio Ca/P (Cociente entre la cantidad molar de calcio y de fósforo), que evidenciará si la región observada presenta o no depósitos de Hap.

La observación microscópica se realizó empleando un microscopio Nova NanoSEM 450 FEI™.

En las imágenes de microscopía (fig. 17), podemos observar, aunque en regiones muy dispersas del aerogel y en zonas pequeñas, depósitos de Hap formando una monocapa sobre el aerogel. Este fenómeno puede observarse desde la primera semana de inmersión en SBF, por lo que podemos deducir que estos aerogeles presentan una alta capacidad de mineralización. Los datos de espectroscopía de dispersión de energía (fig.18) confirman la presencia de Hap en estas regiones, siendo el ratio Ca/P característico de esta forma de fosfato de calcio (Tabla 6).

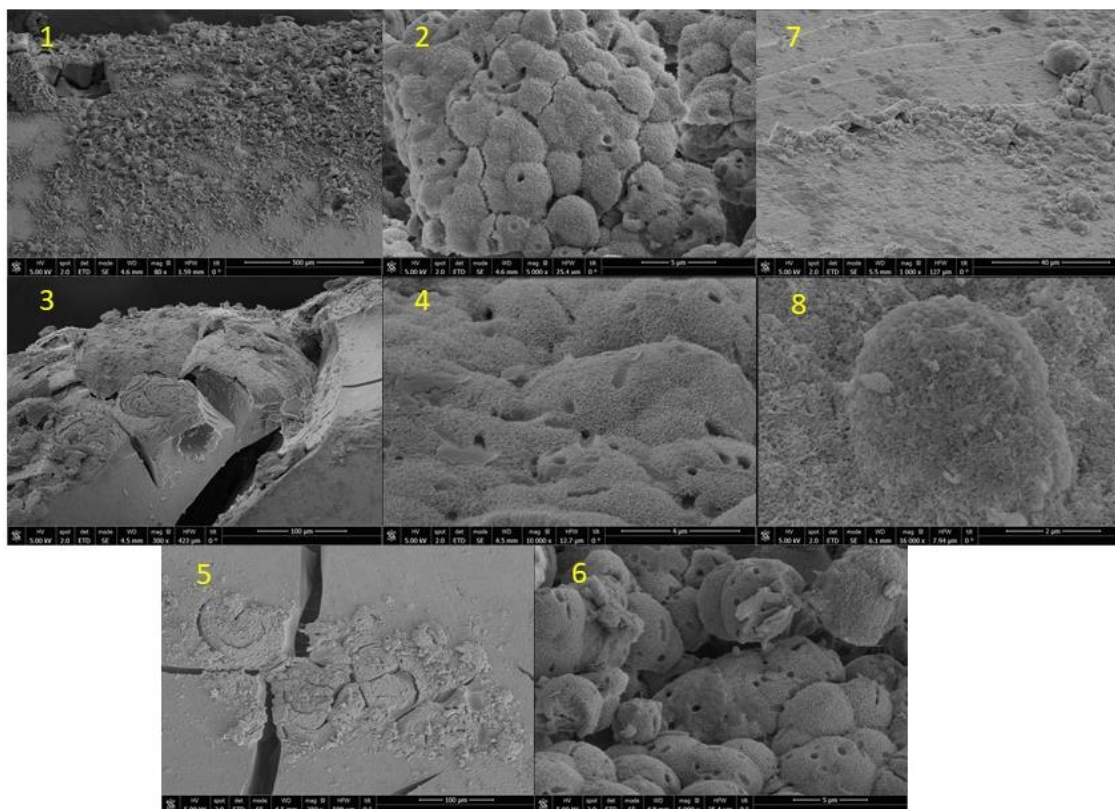


Figura 17: Formaciones de depósitos de HAP en los aerogeles en forma de monocapa. Se aprecian formaciones dispersas de depósitos de HAP en las muestras sumergidas durante una semana (1-2), dos semanas (3-4), tres semanas (5-6) y cuatro semanas (7-8). Las imágenes 1,3,5 y 7 están tomadas a 80X y las imágenes 2,4,6 y 8, están tomadas a 5000X y corresponden con la misma región en cada muestra.

Tabla 6. Ratios Ca/P de las diferentes muestras en comparación con la Hap pura

Tipo de muestra	Ratio Ca/P
Hidroxiapatita pura ($(\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH}))$)	1.67
Aerogel sumergido una semana.	1.95
Aerogel sumergido dos semanas.	1.99
Aerogel sumergido tres semanas.	1.95
Aerogel sumergido cuatro semanas.	2.26

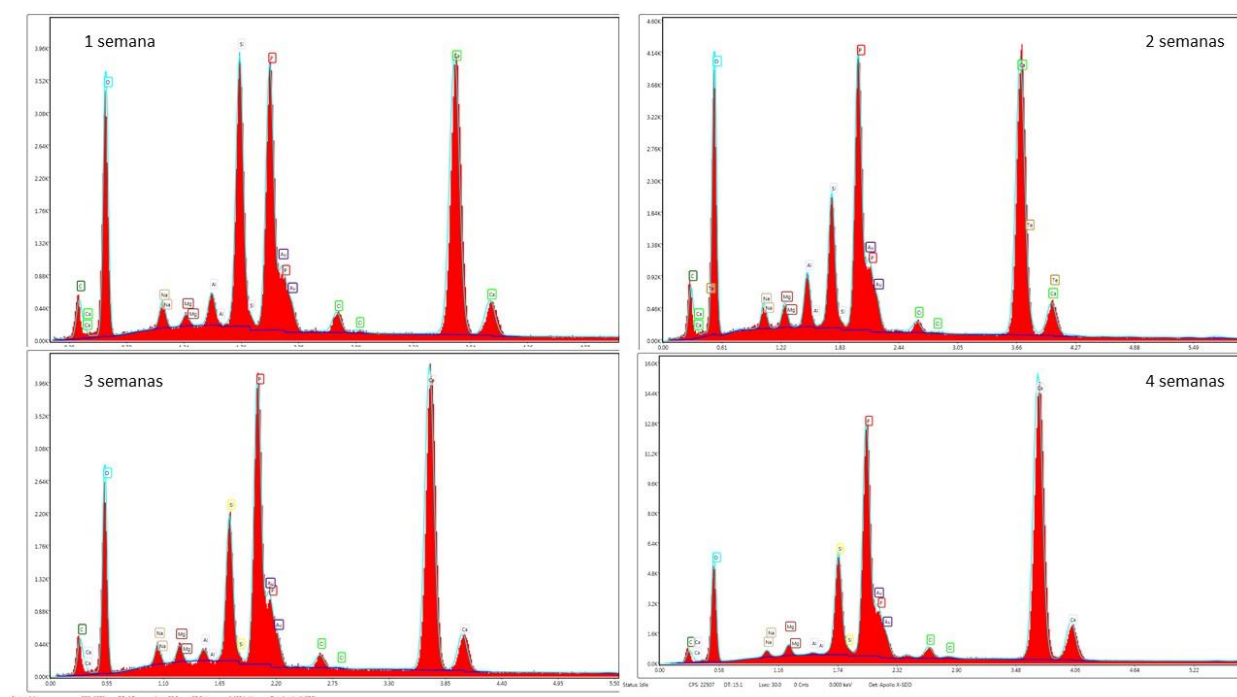


Figura 18: Espectros de dispersión de energía de los diferentes aerogeles. En ellos se pueden apreciar picos característicos del calcio (marcados en cian) y para el fósforo (marcados en rojo). Estos espectros se emplearon para calcular el ratio Ca/P para cada uno de los tiempos de inmersión, y así confirmar la presencia de Hap.

A partir de los datos de microscopía, se puede predecir, según esta aproximación, que los aerogeles una vez implantados presentarán una buena bioactividad y osteoconductividad. Sin embargo, como limitación del estudio, al no disponer de datos de superficie cubierta por los depósitos de Hap, no es posible estimar el índice de bioactividad de las muestras.

6.5. Estudio de la biocompatibilidad en cultivos celulares primarios.

A continuación, es necesario estudiar la biocompatibilidad y citotoxicidad de los aerogeles si se pretenden emplear como sustitutos de injertos óseos. Para ello se realizó un cultivo celular de osteoblastos, procedentes de un cultivo primario de tejido óseo trabecular previo, sobre una pequeña muestra pulverizada (de unos 0.0045g) de aerogel, para más tarde efectuar sobre dicho cultivo un ensayo Live/Dead, que nos permite conocer la tasa de viabilidad de las células del cultivo.

Un ensayo Live/Dead se basa en medir la intensidad de fluorescencia emitida por dos fluorocromos diferentes: El homodímero-1 de etidio (EthD-1) (Apéndice A), que es un agente intercalante del ADN, capaz de introducirse en aquellas células que presentan daños en la estructura de la membrana plasmática y por tanto no son viables. El EthD-1 emite fluorescencia en el rango de las longitudes de onda del rojo, teniendo el máximo de emisión a 635nm. A su vez, la calceína AM es un sustrato de enzimas esterasas intracelulares que la transforman en calceína fluorescente. Ésta es capaz de emitir fluorescencia en el rango de las longitudes de onda del verde, teniendo el máximo de emisión a 515nm. La calceína AM es fuertemente retenida en las células viables.

Conociendo los ratios de fluorescencia verde y roja emitidos por un cultivo teñido con estos fluorocromos bajo microscopía confocal, podemos deducir la tasa de viabilidad del cultivo, y si los aerogeles presentan o no cierta toxicidad.

Para la realización del cultivo celular, previamente se esterilizaron los aerogeles mediante tres métodos diferentes, con el objetivo de estudiar su eficacia o si presentarían algún efecto en la toxicidad de los aerogeles. Estos métodos fueron: esterilización en horno de aire seco, autoclave y radiación ultravioleta. Para la esterilización en horno de aire seco se llevó la muestra mediante un horno a 180°C durante dos horas, la esterilización en autoclave se realizó llevando la muestra a 120°C durante 20 minutos y la esterilización bajo radiación ultravioleta se llevó a cabo exponiendo a la muestra a una radiación ultravioleta de 253.8 nm en campana de flujo laminar. Una vez estériles, las muestras se guardaron bajo flujo laminar en tarros específicos para muestras clínicas, también estériles.

En cuanto al cultivo celular en sí mismo, se partió de un cultivo previo de osteoblastos procedentes de un cultivo primario de tejido óseo trabecular. Este cultivo previo fue sembrado en dos placas de doce pocillos, de forma que se sembraron 50000 células en cada uno, dejando diez pocillos sin sembrar. En cuanto a los pocillos sembrados, tres servirán de control de viabilidad (o control positivo), dos de ellos de control negativo (no viabilidad) y los nueve restantes servirán para determinar la toxicidad de los aerogeles, reservando tres pocillos para cada tratamiento de esterilización. (fig. 19).

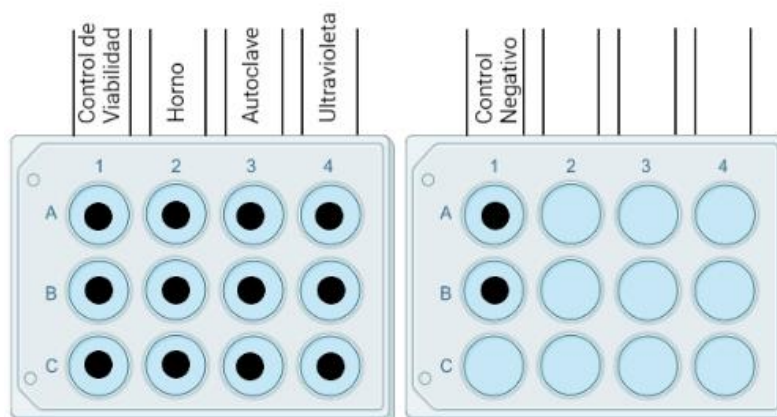


Figura 19: Esquema del diseño experimental realizado para el ensayo Live/Dead. Los puntos negros indican los pocillos que han sido sembrados.

Para realizar la siembra, inicialmente se retiró el medio de cultivo del flask que contenía el cultivo original, para después lavar la monocapa de células presente en el flask con 5mL de una disolución comercial de Hepes, adquirida de la casa PromoCell®. Esta disolución servirá para neutralizar los inhibidores de tripsina que contiene el medio de cultivo, tales como el suero fetal.

Tras este lavado, la disolución de Hepes fue retirada y se añadieron 5mL de una disolución comercial de Tripsina (0.04%) y EDTA (0.03%), también de la casa comercial PromoCell®. La tripsina es una enzima capaz de hidrolizar los enlaces peptídicos con lisina y arginina en su región carboxílica de las proteínas que mantienen a las células unidas entre sí. Esto permite la disociación de las células del cultivo, pudiendo ser trasladadas a otra placa. El EDTA es un agente quelante que capta iones que podrían ser inhibidores de la acción catalítica de la tripsina. Este proceso tuvo lugar en un ambiente a 37°C durante 3 minutos.

Para comprobar si la disociación ha tenido lugar de forma efectiva, se observaron tras ésta las células al microscopio óptico.

A continuación, se añadieron al contenido del flask 5mL de una disolución comercial de TNS obtenida de la casa PromoCell®. El TNS es un inhibidor de tripsina empleado para detener su acción catalítica tras la disociación celular.

Después de la disociación, se transfirió todo el contenido de flask a un tubo falcon y se centrifugó a 600G durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante, y se resuspendió el pellet en 15mL de medio de cultivo comercial específico de osteoblastos obtenido de la casa PromoCell®.

A continuación, se midió la concentración de células viables en el tubo, con el objetivo de llevarla a una concentración de 50000 células/mL para iniciar la siembra en las placas. Para

ello, se tomó una alícuota de 10 μ L del tubo falcon anterior y se le añadieron 10 μ L de Trypan-Blue, que es un compuesto capaz de ser eliminado por las células viables y permanecer en aquellas que no lo son, tiñéndolas de azul. Mediante una observación en un equipo de recuento automático LUNA™ Automated cell counter de la casa Logos® biosystems, se pudo determinar una concentración de células viables de 160000 células/mL, y un porcentaje de viabilidad del 76%.

Con esta información, se calculó que para alcanzar la concentración celular requerida era necesario añadir 5mL más de medio de cultivo al falcon.

Una vez realizado esto, se añadió 1mL del contenido del falcon a cada pocillo de la placa que se pretendía sembrar, y en aquellos pocillos en los que se iba a poner en contacto a las células con el aerogel, se añadieron 0.0045g de éste.

Las placas se mantuvieron en un ambiente a 37°C, con un porcentaje de humedad del 95% y de CO₂ del 5% durante 24 horas.

Al día siguiente se procedió a realizar el ensayo Live/Dead en sí. Para ello, se preparó previamente una mastermix que contenía los fluorocromos, disolviéndose en 20mL de PBS; 40 μ L de una disolución comercial de EthD-1, comercializada a una concentración de 2mM en medio DMSO/Agua 1:4 v/v, y obtenida de la casa comercial MolecularProbes™; y 10 μ L de una disolución comercial de Calceína AM, comercializada a una concentración de 4mM en medio DMSO anhidro, y de la misma casa.

Tras esto, se extrajeron las placas del cultivo realizado el día anterior, a las que se les retiró posteriormente el medio de cultivo y se les hizo un lavado con PBS para eliminar cualquier resto de medio. A continuación, a todos los pocillos, excepto a aquellos destinados al control negativo se les añadió 1mL de PBS para evitar la desecación de los osteoblastos. Al control negativo por su parte se le añadió 1mL de metanol 70%, que inducirá la destrucción celular de los osteoblastos y su muerte. Tras 30 minutos, se retira el contenido de los pocillos y se vuelven a lavar con PBS. A continuación, a cada pocillo se le añadió 1mL del contenido de la mastermix, que tras un periodo de incubación de 30 minutos para dejar a los fluorocromos teñir las estructuras correspondientes, se retiró, para más tarde realizar otro lavado con PBS y añadir 1mL de éste a todos los pocillos para evitar la desecación.

Finalmente, todos los pocillos fueron visualizados en un microscopio confocal OLYMPUS, en los canales del rojo y el verde. Para el caso de los pocillos con aerogeles se realizó una tercera visualización en el visible (fig. 20). Independientemente del pocillo, se tomaron, entre 5 y 10 fotografías de regiones aleatorias de éstos en los canales mencionados, para después, empleando el software ImageJ v. 1.8.0, medir y comparar las intensidades de fluorescencia

obtenidas por cada fluorocromo, representando en un diagrama de cajas y bigotes, el ratio de la fluorescencia verde y roja con respecto a cada tipo de muestra. (fig. 21).

Como podemos observar en las imágenes de microscopía, parece existir cierta disminución de la concentración celular en los pocillos en los que se añadieron los aerogeles con respecto a los controles, además de encontrar, en algunos pocillos cierta superposición entre las imágenes de los fragmentos del aerogel y las células, aunque no se puede asegurar que se deba al hecho de que las células tengan afinidad por adherirse a su superficie, tal y como sugieren estudios previos (Reyes Peces, y otros, 2020), ya que aparecen también células osteoblásticas creciendo directamente en la placa. También podemos asegurar, dada la ausencia de crecimiento microbiológico, a que los tres métodos de esterilización son eficaces en las condiciones planteadas, además de no apreciarse diferencias significativas a simple vista en la concentración celular o en la viabilidad según el método de esterilización utilizado. Cabe resaltar también la mayor presencia de células viables en los cultivos en los que los aerogeles fueron añadidos con respecto a las células no viables en dichos cultivos, por lo que, si estos presentaran cierta toxicidad, sería relativamente baja.

Finalmente es imprescindible mencionar que el estudio presenta varias limitaciones importantes que podrían afectar a sus conclusiones. Para empezar, los aerogeles no se encuentran fijos a la placa, por lo que en el transcurso del experimento es inevitable que estas partículas se muevan, pudiendo inducir, de alguna manera cierto estrés mecánico a las estructuras celulares, que sin duda afectaría significativamente a los resultados de viabilidad. Además, debido a la estructura porosa de los aerogeles, ya descrita previamente, éstos son capaces de absorber los fluorocromos empleados en esta técnica, dando señal de fluorescencia que introduce ruido de fondo en las mediciones de intensidad, afectando negativamente a la exactitud del método.

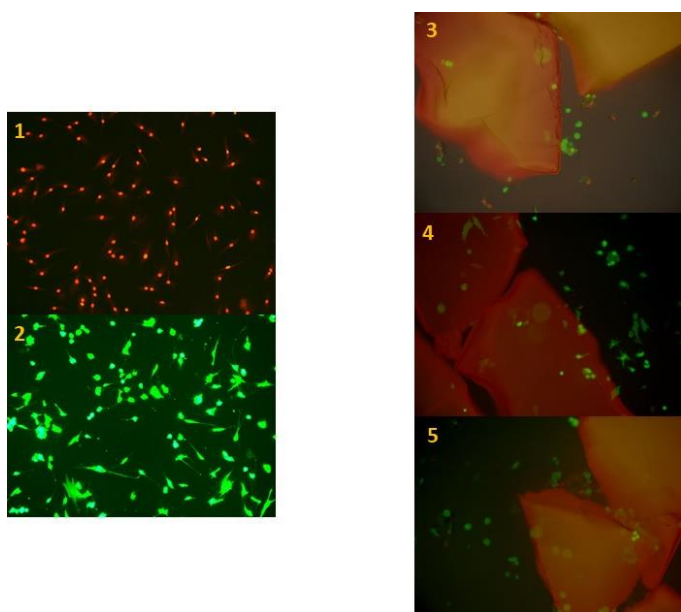


Figura 20: Observación mediante microscopía confocal de los osteoblastos creciendo sobre los aerogeles. A la izquierda se observan los controles negativo (1) y de viabilidad (2), mientras que a la derecha se observan los osteoblastos creciendo sobre los geles esterilizados mediante autoclavado (3), horno (4), y radiación ultravioleta (5). Las imágenes de la derecha son composiciones de las imágenes tomadas en los tres canales mencionados.

Estudiando el diagrama de cajas y bigotes, confirmamos lo que ya se intuía en las observaciones microscópicas. En él vemos que la viabilidad de las células en los cultivos que incluyen los aerogeles, disminuye considerablemente con respecto al grupo control positivo, aunque no llega a ser tan baja como la del control negativo. Se cree que esta disminución de la viabilidad se debe principalmente a las limitaciones del estudio mencionadas anteriormente, en concreto al ruido de fondo introducido por la fluorescencia de los aerogeles, aunque no puede descartarse estrés mecánico en las células. También se observa un valor de viabilidad similar en todas las muestras con aerogeles, independientemente del tratamiento de esterilización, por lo que, al ser tratamientos muy diferentes entre sí, en especial la irradiación con luz ultravioleta, podemos intuir que el procedimiento empleado para esterilizar los aerogeles no afecta de forma significativa a sus propiedades químicas y citotóxicas, aunque para asegurarlo es necesario realizar más estudios y con más profundidad al respecto.

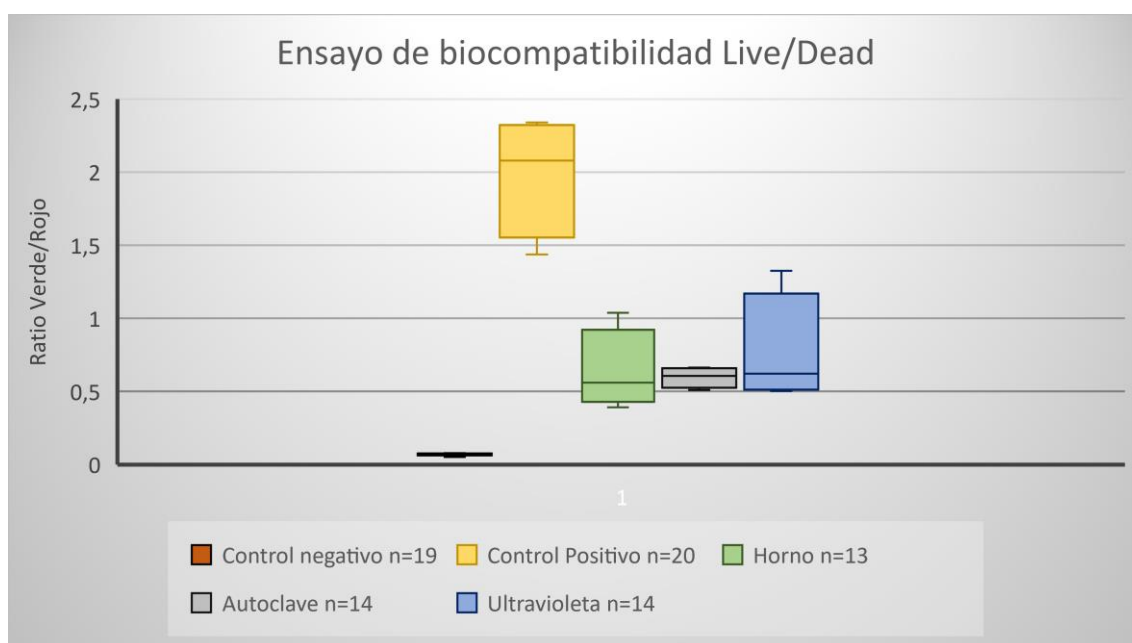


Figura 21: Comparación entre la viabilidad celular observada en los grupos control y en los diferentes tratamientos de esterilización realizados a los aerogeles. Como puede observarse, la viabilidad de las células crecidas sobre los aerogeles disminuye, pero no tanto como en el grupo control negativo. El valor de n mostrado corresponde con el número de fotografías totales tomadas para cada condición.

6.6. Estudio de la degradación *in vitro*.

Finalmente, es necesario estudiar si la red de sílice que constituye el scaffold se degradaría o no tras finalizar el proceso de cirugía, ya que, tal y como afirma, (Reyes Peces, y otros, 2020) una de las características de este tipo de materiales es que a medida que transcurre el proceso de reconstrucción tisular, dicho material va degradándose y sustituyéndose por nuevo tejido.

Para ello, se empleó estudio basado en una aproximación que simula el medio en el que se encontrarían los aerogeles una vez implantados. En él, se sumergieron los aerogeles pulverizados en una disolución comercial de PBS a razón de 1mg/mL de PBS, para después almacenarlos en un ambiente a 37°C. Para el estudio se emplearon 30 mL de PBS divididos en cinco frascos diferentes, cada uno de los cuales contenía 5mg de aerogel.

A continuación, se extrajo a intervalos regulares de tiempo el contenido de cada uno de los frascos, permaneciendo cada uno un tiempo diferente en almacenamiento: 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 120 horas y 168 horas respectivamente. El contenido extraído fue filtrado a través de un filtro de 45 μ m y analizado mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) (Apéndice A), para silicio.

Esto nos permitire conocer la evolución de la concentración de silicio en el medio a medida que transcurre el tiempo (fig. 22), pudiendo estimar de esta forma la tasa a la cual los aerogeles pierden silicio de su red cristalina, pudiendo así evaluar su degradación

También se evaluó la pérdida de masa de los aerogeles en el proceso (fig. 22). Para ello se sumergieron de igual manera 0.75mg de aerogel en 750 μ L de PBS y se almacenó el conjunto a 37°C. Se midió la masa de los aerogeles cada semana durante un total de nueve semanas, renovando el PBS tras cada medición para mantener su composición más o menos constante.

Los resultados revelan que las muestras sufren en efecto un proceso de degradación paulatina durante el tiempo. La pérdida de sílice por parte de los aerogeles empieza siendo relativamente acusada durante los tres primeros días, para después empezar a detenerse, probablemente al alcanzarse el equilibrio químico. En un sistema vivo, el silicio liberado al suero se eliminaría del organismo al alcanzarse la homeostasis, permitiendo de esta forma la continua liberación de silicio de los aerogeles.

Este hecho se aprecia sustancialmente al analizar la pérdida de masa de los aerogeles, ya que esta se va perdiendo de forma continua a lo largo de los días. En dos meses los aerogeles pierden alrededor del 50% de su masa original, situando en este punto la semivida de la red de sílice-CS.

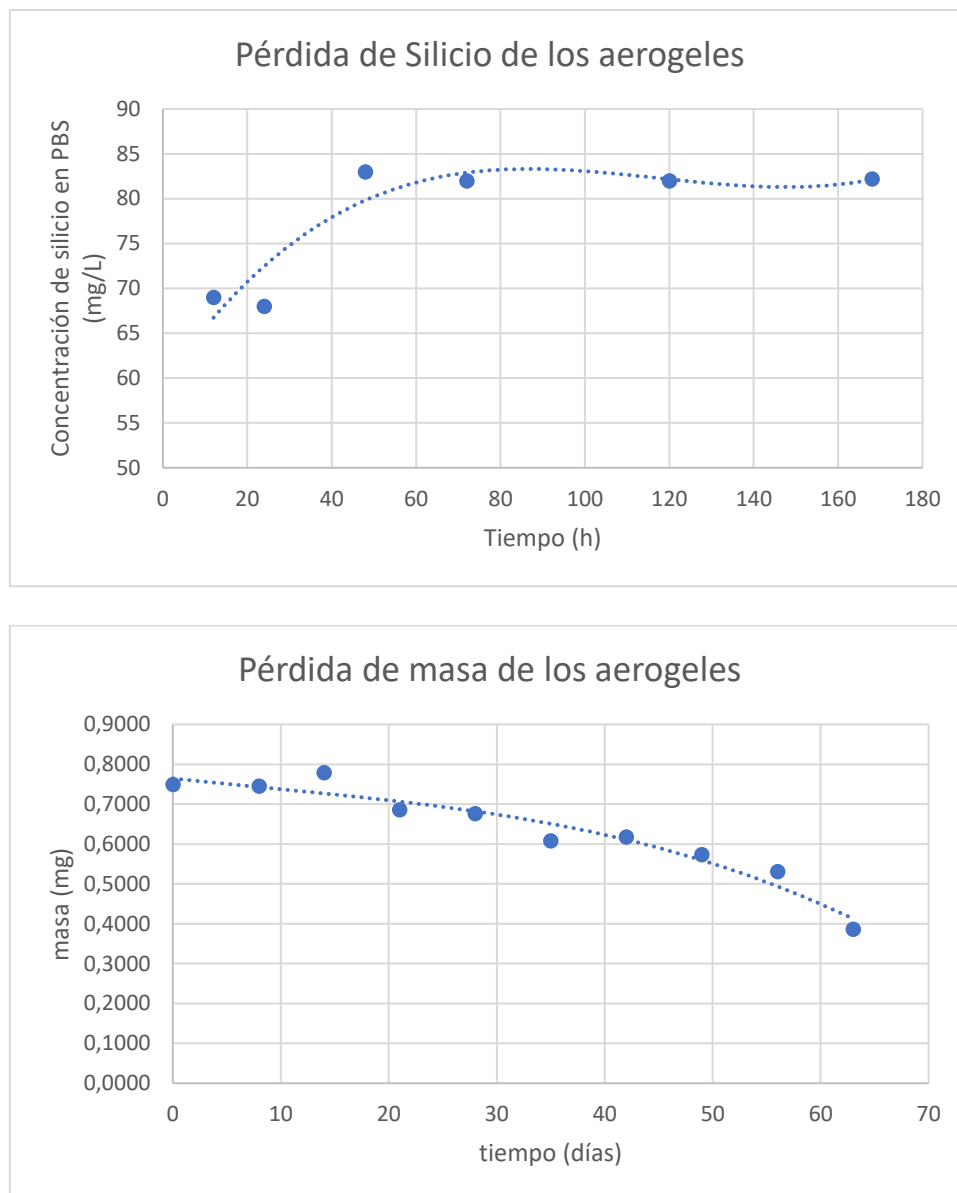


Figura 22: Diagramas en los que se muestran la pérdida de silicio (arriba) y masa (abajo) en los aerogeles a lo largo del tiempo.

7. Conclusiones y perspectivas de futuro.

En este trabajo, se han sintetizado y caracterizado aerogeles de sílice-CS con una concentración teórica de CS del 20% en peso. Sin embargo, un análisis elemental posterior de las muestras ha revelado una concentración de CS del 9.66%, por lo que podemos afirmar que la síntesis de este tipo de aerogeles no se ajusta a la composición nominal deseada. Sin embargo, la caracterización posterior de estos aerogeles permite responder a las cuestiones planteadas inicialmente relativas a su estructura química, arquitectura, y propiedades mecánicas y biológicas, así como en su capacidad de degradación tras una cirugía.

En cuanto a su estructura química, caracterizada gracias al análisis FTIR, podemos afirmar satisfactoriamente que se ha formado una red híbrida de sílice-CS, siendo la ruta principal de reacción, el ataque nucleofílico de la amina primaria del CS al grupo epóxido del GPTMS y la posterior condensación de los grupos hidroxilo del GPTMS y el TEOS. Sin embargo, no es posible descartar completamente la acción de otras rutas de reacción en el proceso.

En cuanto a la arquitectura y textura superficial de los aerogeles, determinada por el análisis de fisisorción de nitrógeno, se puede afirmar que la red de sílice presenta una estructura mesoporosa en la que los poros se encuentran interconectados entre sí, dando lugar a una estructura con alta superficie específica, que posibilitará la absorción de sustancias administrables durante el tratamiento de fracturas graves, tales como factores de crecimiento y analgésicos.

En cuanto a las propiedades mecánicas, medidas mediante los análisis de compresión uniaxial y DMA, podemos afirmar que existe un aumento de la resistencia mecánica de los aerogeles con respecto a estructuras puras de sílice, lo que hace estos materiales más adecuados para su uso en clínica, además de que estas propiedades no se ven sumamente afectadas por oscilaciones y movimiento al que se podría someter el aerogel en condiciones fisiológicas. Esto es útil en el caso de que el paciente requiriese de procesos de rehabilitación tras la cirugía.

En cuanto a las propiedades biológicas de los aerogeles, obtenidas mediante los ensayos de Kokubo y Live/Dead, podemos afirmar que se predice de ellos una bioactividad alta dados los depósitos de HAp formados en la superficie de los aerogeles. Sin embargo, no podemos asegurar con rotundidad esta bioactividad hasta realizar un cultivo celular continuado de osteoblastos, en el que se observe experimentalmente que éstos son capaces de sintetizar nueva matriz ósea tras fijarse a la superficie de aerogeles, o bien ensayos en modelos murinos sometidos a fracturas, en los que se compararía la actividad biológica de los aerogeles con respecto a un grupo control. En cuanto a su citotoxicidad, podemos afirmar que los aerogeles no parecen presentar una toxicidad importante que pudiera comprometer la salud o el proceso de curación del paciente, aunque de nuevo, esto no puede asegurarse, dadas las limitaciones experimentales expuestas.

Finalmente, mediante el un análisis de ICP-MS se pudo determinar que los aerogeles presentan la capacidad de degradarse espontáneamente tras un proceso quirúrgico.

En definitiva, podemos afirmar que este tipo de aerogeles representarían una alternativa importante al empleo de injertos tradicionales, aunque es necesario realizar estudios más exhaustivos sobre esto, incluyendo entre ellos ensayos empleando modelos murinos y ensayos clínicos para confirmar y afianzar el conocimiento que actualmente tenemos sobre estos materiales.

9. Bibliografía.

- Ballester Alfaro, J., & Sueiro Fernández, J. (2017). *Biomateriales y sustitutos óseos en Traumatología y Cirujía Ortopédica*. Departamento de Anatomía Patológica, UCA: Ciencias Biomédicas. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz.
- Bardestani, R., Patience, G., & Kaliaguine, S. (2019). Experimental Methods in Chemical Engineering: Specific Surface Area and Pore Size Distribution Measurements-BET, BJH, DFT. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 97, 2781-2791.
- Boccardi, E., Philippart, A., Juhasz-Bortuzzo, J., Beltrán, A., Novajra, G., Vitale-Brovarone, C., . . . Boccaccini, A. (2015). Uniform surface modification of 3D bioglass-based scaffolds with mesoporous silica particles (MCM-41) for enhancing drug delivery capability. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3.
- Chen, Q., & Thouas, G. (2015). *Biomaterials. A basic introduction*. CRC Press.
- Clark, E. M. (2014). The epidemiology of fractures in otherwise healthy children. *Current osteoporosis Reports*(12), 272-278.
- Connell, L. S., Romer, F., Suárez, M., Valliant, E. M., Zhang, Z., Lee, P. D., . . . Jones, J. R. (2014). Chemical characterisation and fabrication of chitosan-silica hybrid scaffolds with 3-glycidoxypopyl trimethoxysilane. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(6), 668-680.
- Fillingham, Y., & Jacobs, J. (2016). Bone grafts and their substitutes. *The Bone and Joint Journal*(98-B), 6-9.
- Geneser, F., Qvortrup, K., Tranum-Jensen, J., Christensen, E. I., & Bruel, A. (2012). *Histología*. Editorial Médica Panamericana.
- Klein, L., Aparicio, M., & Jitianu, A. (2018). *Handbook of Sol-Gel Science and Technology. Processing, Characterization and Applications* (2º Edición ed.). Springer.
- Lamers, E., van Horssen, R., te Riet, J., van Delft, F., Luttge, R., Walboomers, X., & Jansen, J. (2010). The influence of nanoscale topographical cues on initial osteoblast morphology and migration. *European Cells and Materials*, 20, 329-343.
- Montes, J., Cuevas, F., & Cintas, J. (2014). *Ciencia e Ingeniería de los Materiales*. Madrid: Paraninfo.
- Naohiro, S., & Jupiter, D. C. (2015). Bone Graft Substitute. Allograft and Xerograft. *Clinical Podiatric Medical Surgery*, 32(1), 21-34.
- Pérez Moreno, A., Reyes Peces, M. d., de los Santos, D. M., Pinaglia Tobaruela, G., de la Orden, E., Vilches Pérez, J. I., . . . de la Rosa-Fox, N. (2020). Hydroxyl Groups Induce Bioactivity in Silica/Chitosan Aerogels Designed for Bone Tissue Engineering. In Vitro Model for the Assessment of Osteoblasts Behavior. *Polymers*(12), 2802.
- Piergiorgio, G., Mattioli-Belmonte, M., Chiono, V., Ferretti, C., Baino, F., Tonda-Turo, C., . . . Ciardelli, G. (2012). Bioactive glass/polymer composite scaffolds mimicking bone tissue. *Journal of biomedical materials research*, 100A(10), 2654-2667.
- Pietu, G., Lebaron, M., Flecher, X., Hulet, C., Vandenbussche, E., & SOFCOT. (2014). Epidemiology of distal femur fractures in France in 2011–12. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research*(100), 545-548.

- Przekora, A. (2019). Current Trends in Fabrication of Biomaterials for Bone and Cartilage Regeneration: Materials Modifications and Biophysical Stimulations. *International Journal of Molecular Sciences*, 435(20), 2.
- Ravarian, R., Moztaezadeh, F., Hashjin, S. M., Rabiee, S., Khoshakhlagh, P., & Tahriri, M. (2010). Synthesis, characterization and bioactivity investigation of bioglass/hydroxyapatite composite. *Ceramics International*, 36, 291-297.
- Reyes Peces, M. V. (2018). Síntesis y caracterización de aerogeles híbridos SiO₂/dióxido de dimetilsilano para la eliminación de solventes orgánicos del agua por absorción selectiva. *Trabajo de Fin de Máster*.
- Reyes Peces, M. V., Pérez Moreno, A., de los Santos, D., Mesa Díaz, M., Pinaglia Tobaruela, G., Vilches Pérez, I., . . . Piñero, M. (2020). Chitosan-GPTMS-Silica Hybrid Mesoporous Aerogels for Bone Tissue Engineering. *Polymers*(12).
- Ross, M. H., & Paulina, W. (2007). *Histología. Texto y atlas a color con biología celular y molecular*. Editorial Médica Panamericana.
- Sandoval Ibarra, F. D., López Cervantes, J. L., & García Fadrique, J. (2015). Ecuación de Langmuir en líquidos simples y tensoactivos. *Educación Química*, 26, 307-313.
- Wang, D., Romer, F., Connell, L., Walter, C., Saiz, E., Yue, S., . . . Jones, J. R. (2015). Highly flexible silica/chitosan hybrid scaffolds with oriented pores for tissue regeneration. *Journal of Materials chemistry B*, 3.

10. Apéndices.

Apéndice A: Listado de siglas y acrónimos empleados ordenados alfabéticamente.

- BET: Método de Bruanuer, Emmet y Teller
- BJH: Método de Barrett, Joyner y Halenda
- CS: Quitosano
- DMA: Análisis Dinámico-Mecánico
- EthD-1: Homodímero-1 de etidio
- FTIR: Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier
- GPTMS: 3-glicidoxipropil-trimetoxisilano
- HAp: Hidroxiapatita
- ICP-MS: Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
- IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
- PBS: Solución Buffer fosfato
- SBF: Fluido Corporal Simulado
- SEM: Microscopía electrónica de barrido
- TEOS: Tetraetilortosilicato